

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 1月 4日

出 願 番 号

Application Number:

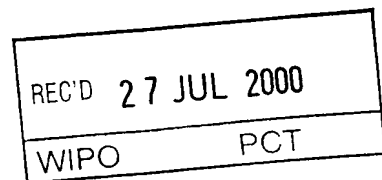
特願2000-000049

10/000815

出 願 人

Applicant (s):

住友金属工業株式会社



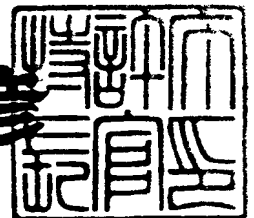
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 6月29日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3054138

【書類名】 特許願

【整理番号】 1991506

【提出日】 平成12年 1月 4日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C30B 29/58

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県尼崎市扶桑町1番8号 住友金属工業株式会社エレクトロニクス技術研究所内

 【氏名】 秋岡 幸司

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県尼崎市扶桑町1番8号 住友金属工業株式会社エレクトロニクス技術研究所内

 【氏名】 三城 明

【特許出願人】

 【識別番号】 000002118

 【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

 【氏名又は名称】 住友金属工業株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100064746

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 深見 久郎

【選任した代理人】

 【識別番号】 100085132

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 森田 俊雄

【選任した代理人】

 【識別番号】 100083703

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 仲村 義平

【選任した代理人】

【識別番号】 100099922

【弁理士】

【氏名又は名称】 甲田 一幸

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008693

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 有機分子の結晶調製装置および結晶調製方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 溶液中に含まれる帯電した有機分子の結晶を前記溶液から調製するための装置であって、

所定の材料からなる第 1 の固体表面と、

前記第 1 の固体表面から突出するように設けられたアイランド上に与えられる第 2 の固体表面とを備え、

前記第 1 の固体表面と前記第 2 の固体表面とは、同時に前記溶液に接触できるよう配置されており、

前記第 1 の固体表面と前記第 2 の固体表面とは、前記溶液と接触するとき、互いに異なる表面電位またはゼータ電位を示し、

前記溶液と接触するとき、前記第 2 の固体表面は、その上で前記有機分子の結晶が成長できるよう前記第 1 の固体表面よりも前記有機分子をより強く静電的に吸着させることができ、かつ

前記第 2 の固体表面は、前記有機分子の結晶がその表面をはみ出して成長できるような幅を有することを特徴とする、有機分子の結晶調製装置。

【請求項 2】 前記幅は $10\ \mu\text{m}$ ～ $200\ \mu\text{m}$ であることを特徴とする、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 3】 前記アイランドを囲むように前記第 1 の固体表面上に設けられた、前記溶液を保持するための囲い壁を有することを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の装置。

【請求項 4】 前記第 1 の固体表面および前記アイランドは、同一の基板上に設けられており、

前記第 1 の固体表面は、当該基板の表面または当該基板表面に形成された半導体化合物膜もしくは金属化合物膜の表面であり、

前記第 2 の固体表面は、第 1 の固体表面上の所定の領域に形成される半導体化合物のアイランドまたは金属化合物のアイランドの表面であることを特徴とする、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 5】 前記基板がシリコン基板であることを特徴とする、請求項 4 に記載の装置。

【請求項 6】 前記第 1 の固体表面と前記第 2 の固体表面とは、所定の領域において互いに隣合うよう配置され、かつ

前記所定の領域において、前記第 2 の固体表面の面積は、前記第 1 の固体表面の面積より小さいことを特徴とする、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 7】 前記幅の異なる複数の前記第 2 の固体表面を有することを特徴とする、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 8】 前記第 1 の固体表面がシリコンまたはシリコン酸化物からなり、かつ前記第 2 の固体表面が金属酸化物または金属水酸化物からなることを特徴とする、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 9】 前記有機分子がタンパク質であることを特徴とする、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 10】 溶液中に含まれる帯電した有機分子の結晶を前記溶液から調製する方法であって、

前記有機分子を含み、かつ前記有機分子の等電点以外の pH を有する溶液を、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載される装置の前記第 1 の固体表面および前記第 2 の固体表面に接触させる工程と、

前記第 2 の固体表面上で前記有機分子の結晶が成長するよう、前記接触を維持する工程とを備えることを特徴とする、有機分子の結晶調製方法。

【請求項 11】 前記有機分子を含む溶液の pH は、前記第 1 の固体表面に前記有機分子と同じ極性の表面電位またはゼータ電位をもたらすものであり、かつ前記第 2 の固体表面に前記有機分子と逆の極性の表面電位またはゼータ電位をもたらすものであることを特徴とする、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】 溶液中に含まれる帯電した有機分子の結晶を前記溶液から調製する方法であって、

前記有機分子を含み、かつ前記有機分子の等電点以外の pH を有する溶液を、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載される装置の前記第 1 の固体表面および前記

第 2 の固体表面に接触させる工程と、

前記装置を密封して、前記第 1 の固体表面および前記第 2 の固体表面に前記溶液が接触している状態を所定時間維持する工程とを備えることを特徴とする、有機分子の結晶調製方法。

【請求項 1 3】 前記有機分子を含む溶液の pH は、前記第 1 の固体表面に前記有機分子と同じ極性の表面電位またはゼータ電位をもたらすものであり、かつ前記第 2 の固体表面に前記有機分子と逆の極性の表面電位またはゼータ電位をもたらすものであることを特徴とする、請求項 1 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、有機分子の結晶調製装置および結晶調製方法に関し、特に、タンパク質、酵素等の種々の生体高分子、およびそれらの複合体を含む有機高分子の結晶化に適用される装置および方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

タンパク質等の生体高分子の結晶化は、通常は無機塩等の低分子量化合物の場合と同様、高分子を含む水または非水溶液から溶媒を奪う処理を施すことにより、過飽和状態にして、結晶を成長させるのが基本となっている。このための代表的な方法として、バッチ法、透析法および気液相間拡散法があり、これらは、試料の種類、量、性質等によって使い分けられている。

【0 0 0 3】

図 2 5 (a) および図 2 5 (b) は、気液相間拡散法に含まれるハンギングドロップ法およびシッティングドロップ法を概略的に示す。図 2 5 (a) に示すハンギングドロップ法では、沈殿剤 2 2 2 を収容する密閉容器 2 2 0 内において、結晶化すべき生体高分子を含む母液 2 2 1 が垂下される。図 2 5 (b) に示すシッティングドロップ法では、密閉容器 2 3 0 内において、プレート 2 3 3 上に結晶化すべき生体高分子を含む母液 2 2 1 が置かれる。沈殿剤 2 2 2 は、密閉容器 2 3 0 内において、別の容器 2 3 1 に収容される。これらの方法では、沈殿剤お

よび母液中の揮発成分の蒸発によって、緩やかに平衡が成立する。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

X線結晶構造解析により生体高分子の3次元構造を決定するためには、目的とする物質を抽出・精製後、結晶化することが必須となる。しかし、現在のところ、どの物質に対しても適用すれば必ず結晶化できるといった手法および装置がないため、勘と経験に頼ったトライアンドエラーを繰返しながら結晶化を進めているのが実状である。生体高分子の結晶を得るためには、非常に多くの実験条件による探索が必要であり、結晶成長がX線結晶解析の分野での最も大きなボトルネックとなっている。

【0005】

生体高分子の結晶は、概して、他の物質とは異なり、多量（たとえば ≥ 50 体積%）の溶媒（母液）を含んでいる。そのような結晶を空気中に放置すると、溶媒が飛散し、結晶は壊れてしまう。これを防ぐため、一般に、結晶をガラス製キャピラリー中に母液とともに封入し、濃度およびpHが平衡である母液の雰囲気下でX線結晶構造解析実験を行っている。最近では、生体高分子結晶を液体窒素などで瞬時に凍らせるflash coolingといわれる手法を用い、結晶に含まれる溶媒をガラス状態に保ってX線結晶構造解析を行うこともある。いずれにせよ、母液から十分な大きさの結晶を成長させ、それを破壊させることなくX線構造解析に供することが重要である。

【0006】

本発明の目的は、X線構造解析を可能にし得る大型の結晶をもたらすことができ、かつ生成した結晶を破壊することなく容易に取り出すことができる装置および方法を提供することである。

【0007】

本発明のさらなる目的は、タンパク質を初めとした生体高分子の結晶を固体表面上で成長させる技術において、結晶を取り出すプロセスの欠点を技術的に解消することである。

【0008】

本発明のさらなる目的は、少量の生体高分子溶液で、結晶化を可能にするための技術を提供することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明により、溶液中に含まれる帯電した有機分子の結晶を溶液から調製するための装置が提供され、該装置は、所定の材料からなる第1の固体表面と、第1の固体表面から突出するように設けられたアイランド上に与えられる第2の固体表面とを備える。第1の固体表面と第2の固体表面とは、同時に溶液に接触できるように配置されている。第1の固体表面と前記第2の固体表面とは、結晶化すべき分子を含む溶液と接触するとき、互いに異なる表面電位またはゼータ電位を示す。また、結晶化すべき有機分子を含む溶液と接触するとき、第2の固体表面は、その上で該有機分子の結晶が成長できるよう第1の固体表面よりも該有機分子をより強く静電的に吸着させることができる。さらに、第2の固体表面は、該有機分子の結晶がその表面をはみ出して成長できるような幅を有する。すなわち、該幅は、生成され得る有機分子の結晶径よりも狭いものとされている。たとえば、タンパク質では、一般的に約0.2mm～約0.5mmのサイズ（径）の結晶がX線回折装置を用いた結晶構造解析に適している。したがって、第2の固体表面の幅は、そのサイズより小さいもの、たとえば、10μm～200μmが好ましく、10μm～100μmがより好ましい。

【0010】

本発明による装置において、第1の固体表面は、金属、半導体およびそれらの化合物よりなる群から選ばれた材料からなることができる。また、第2の固体表面も、金属、半導体およびそれらの化合物よりなる群から選ばれた材料からなることができる。

【0011】

本発明による装置は、アイランドを囲むように第1の固体表面上に設けられた、溶液を保持するための囲い壁を有してもよい。本発明による装置において、第1の固体表面およびアイランドは、同一の基板上に設けられてもよく、第1の固体表面は、当該基板の表面または当該基板表面に形成された半導体化合物膜もし

くは金属化合物膜の表面とすることができ、第2の固体表面は、第1の固体表面上の所定の領域に形成される半導体化合物のアイランドまたは金属化合物のアイランドの表面とすることができる。当該基板はシリコン基板とすることができる。

【0012】

本発明による装置において、第1の固体表面と第2の固体表面とは、所定の領域において互いに隣合うよう配置することができる。該所定の領域において、第2の固体表面の面積は、第1の固体表面の面積より小さいことが好ましい。また、本発明による装置は、幅の異なる複数の第2の固体表面を有してもよい。本発明による装置において、第1の固体表面はシリコンまたはシリコン酸化物からなり得、第2の固体表面は金属酸化物または金属水酸化物からなり得る。

【0013】

本発明による装置は、特にタンパク質の結晶化に適している。

さらに、本発明により、溶液中に含まれる帯電した有機分子の結晶を溶液から調製する方法が提供される。該方法は、有機分子を含み、かつ該有機分子の等電点以外のpHを有する溶液を、上記装置の第1の固体表面および第2の固体表面に接触させる工程と、第2の固体表面上で該有機分子の結晶が成長するよう、該接触を維持する工程とを備える。有機分子を含む溶液のpHは、第1の固体表面に該有機分子と同じ極性の表面電位またはゼータ電位をもたらすものであり、かつ第2の固体表面に該有機分子と逆の極性の表面電位またはゼータ電位をもたらすものであることが望ましい。

【0014】

また、本発明により、溶液中に含まれる帯電した有機分子の結晶を溶液から調製する他の方法が提供される。該方法は、有機分子を含み、かつ該有機分子の等電点以外のpHを有する溶液を、上記装置の第1の固体表面および第2の固体表面に接触させる工程と、該装置を密封して、第1の固体表面および第2の固体表面に溶液が接触している状態を所定時間維持する工程とを備える。有機分子を含む溶液のpHは、第1の固体表面に該有機分子と同じ極性の表面電位またはゼータ電位をもたらすものであり、かつ第2の固体表面に該有機分子と逆の極性の表

面電位またはゼータ電位をもたらすものであることが望ましい。

【0015】

【発明の実施の形態】

タンパク質を初めとする生体高分子のほとんどは、溶液内において幾何学的に特異的な構造および静電的な相互作用（静電斥力・引力、ファンデルワールス力）によって分子間同士の認識が行なわれている。静電的なエネルギーに基づく分子間の相互作用においては、個々の分子最表面でのわずかな空間的な電荷分布の相違が、分子間の認識度合い、分子集合体の作りやすさに決定的な影響を及ぼすことが予想される。したがって、溶液内をブラウン運動しながら衝突を繰返している個々の分子では、周期的かつ規則的な構造を有する分子集合体の核が非常に形成されにくいと考えられる。

【0016】

タンパク質分子の結晶生成に関しては、その核生成の初期過程が重要であるとの報告がなされている。結晶化の初期過程において核となる分子を2次元的に配列させる何らかの条件が整えば、その後の結晶化は、これを核としてエピタキシャル的に進行するものと考えられる。

【0017】

本発明による装置および方法は以下に説明するような作用機構に基づき、有機分子の選択的吸着を行ない、その結果、特定の領域に結晶核が形成され、好ましい結晶成長をもたらすことができる。

【0018】

図1に示すように、本発明による装置10は、第1の表面11aを有する第1の固体11、および第2の表面12aを有するアイランド状の第2の固体12を有する。第1の固体11と第2の固体12は、実質的に異なる材料からなってもよいし、共通する主材料を有してもよい。ここで、「実質的に異なる」とは、固体を構成する主材料が異なっていることを意味する。両者の固体が共通する主材料を含む場合、一般に、不純物、微量成分等の副材料の量または種類が互いに異なっている。固体を構成する材料は、たとえば金属、半導体、またはそれらの化合物、たとえば酸化物、水酸化物、窒化物等である。装置10は、タンパク質等

の結晶化すべき有機分子 1 3 を含む溶液 1 4 と接触させられる。タンパク質等の有機分子 1 3 の表面は、分子全体をマクロ的に見た場合、その分子の等電点以外の pH を有する溶液において、通常、正または負に帯電している。一方、本発明による装置において、上述した材料の表面 1 1 a および 1 2 a も、溶液 1 4 中で帯電する。このとき、表面についての電位の大きさおよび極性は、固体の材質および溶液の pH に依存する。たとえば、ある pH の溶液中で、固体表面 1 1 a は負に帯電し、固体表面 1 2 a は正に帯電する。一方、有機分子 1 3 は、当該 pH の溶液中で負に帯電する。この場合、溶液 1 4 中の有機分子 1 3 は、有機分子 1 3 と逆の極性で帯電する固体表面 1 2 a に静電的な引力に従って選択的に吸着される。有機分子 1 3 と同じ極性で帯電する固体表面 1 1 a への吸着は、静電作用により阻害される。こうして、固体表面 1 2 a 上での有機分子 1 3 の結晶核が形成され、結晶化が進められる。

【 0 0 1 9 】

図 1 に示すように、本発明による装置において、有機分子を強く静電吸着させるべき表面 1 2 a は、突出した部分に与えられる。本明細書において、この突出し、有機分子が吸着できるような表面を与える部分をアイランドと呼ぶ。図 1 に示すように、アイランド（固体 1 2）は、有機分子が吸着しにくい表面 1 1 a からせり出すように設けられる。アイランド上には、有機分子を吸着すべき表面が与えられる。通常、この表面はアイランドの頂部に与えられる。加えて、図 2（a）に示すように、表面 1 2 a は、有機分子の結晶 1 3 a が表面 1 2 a をはみ出して成長できるような幅 d_1 を有する。すなわち、幅 d_1 は、形成すべき結晶のサイズ（径） D_1 より狭いものである。アイランド表面の幅をこのように設定することによって、成長した結晶とアイランド表面との接触面積は制限される。こうして、アイランド表面の結晶に対する吸着力を制限し、成長した結晶を取り出しやすくしている。幅 d_1 は、結晶化すべき分子種に応じて適当な範囲に設定される。たとえば、タンパク質の場合、約 0.2 ～ 約 0.5 mm の径を有する結晶が一般に X 線結晶構造解析に適しているため、その径より小さい幅、たとえば 10 ～ 200 μ m の幅が好ましく、10 ～ 100 μ m の幅がより好ましい。一方、図 2（b）に示すように、アイランド表面 2 2 a の幅 d_2 が、得られる結晶 2 3 a

の径 D_2 よりも広い場合、アイランド表面 2 2 a の結晶 2 3 a に対する吸着力が大きくなりすぎ、結晶 2 3 a が取り出し難くなり得る。このような場合、たとえば、ピペットで結晶を吸い取って回収するとき、結晶が壊れてしまうことがある。一方、図 2 (a) に示すようにアイランドの吸着力が制限されている場合、結晶をアイランドから離脱させやすく、結晶を壊すことなくピペットに吸い取ることができる。

【 0 0 2 0 】

本発明による装置のため、所望の表面電位を有し、かつ溶液中で安定な任意の材料を使用できる。そのような材料は、ドーピングによって表面電位の制御が可能なシリコン等の半導体材料の他、電解質溶液中で表面水酸基が生成され、この水酸基の解離により所望の表面電荷をもたらす得る金属または半導体の酸化物または水酸化物、同様に表面電荷をもたらす得る他の無機化合物、および有機高分子などの有機化合物を含む。本発明による装置を構成する材料は、以下に説明するメカニズムを考慮して選択することができる。

【 0 0 2 1 】

一般に、タンパク質分子、コロイド粒子、ならびに金属、半導体、およびそれらの酸化物、水酸化物または窒化物などの化合物の表面は、水溶液中で、その溶液の pH 値によって定まる表面電位（一般にゼータ電位として測定できる）に帯電する。この表面電位が見かけ上ゼロになるときの溶液の pH 値が、等電点である。等電点は物質によって異なるが、この等電点より低い pH において物質は正に帯電し、等電点より高い pH において物質は負に帯電する。本発明は、このような物質の性質を利用して、有機分子の選択的結晶化を行なう。たとえば、図 3 に示すような関係が複数の固体表面と分離すべきタンパク質との間に成立するとする。曲線 S_1 は、第 1 の固体表面についての表面電位と pH との関係を表し、曲線 S_2 は、第 2 の固体表面（アイランド表面）についての表面電位と pH との関係を表し、曲線 P は、タンパク質の表面電位と pH との関係を表す。第 1 の固体表面の等電点は 3、タンパク質の等電点は 6、第 2 の固体表面の等電点は 9 である。したがって、斜線で示す領域の pH（タンパク質の等電点と第 2 の固体表面の等電点の間の pH）を有する溶液において、第 1 の固体表面およびタンパク

質は負に帯電し、第2の固体表面は正に帯電する。このpH領域において、タンパク質は、第2の固体表面に静電引力により選択的に吸着または固定され、その結果、第2の固体表面でタンパク質の結晶成長が促進され得る。一方、タンパク質と第1の固体表面との間には、静電斥力が働く。一方、図4に示すような関係が成立するとする。この場合、第1の固体表面の等電点は9、タンパク質の等電点は6、第2の固体表面（アイランド表面）の等電点は3である。そして、第2の固体表面の等電点とタンパク質の等電点の間のpHを有する溶液において、第1の固体表面およびタンパク質は正に帯電し、第2の固体表面は負に帯電する。したがって、斜線に示す領域のpHにおいて、静電引力により、タンパク質を第2の固体表面に選択的に吸着させることができる。このように、母液のpHを適当な値に設定することで、アイランド表面に選択的に分子を静電吸着させ、その結果、その表面に結晶核を形成させて、分子の結晶成長を起こさせることができる。

【0022】

たとえば、酸化シリコン (SiO_2) の等電点は1.8~2.8であり、したがって、それより低いpHにおいて SiO_2 は正に帯電し、それより高いpHにおいて負に帯電する。一方、アルミナ ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$) の等電点は9付近である（なお、 $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ の等電点は7.4~8.6程度である）。また、ほとんどのタンパク質は4~7の等電点を有する（たとえば、ヒト血清アルブミン4.7~5.2、ウシインスリン5.3~5.8、インターフェロン（ニワトリ胚）7~8、ヒト成長ホルモン4.9~5.2）。したがって、たとえば、図1に示す装置において、第1の固体11を SiO_2 とし、第2の固体（アイランド）12をアルミナとすれば、タンパク質を含み、かつ6~8のpH（タンパク質の等電点とアルミナの等電点の間の値）を有する溶液14中で、 SiO_2 は負に帯電し、アルミナは正に帯電する。一方、4~7の等電点を有するタンパク質は、通常、負に帯電する。したがって、溶液中のタンパク質は、正に帯電するアルミナに選択的に吸着され得る。一方、タンパク質の SiO_2 上への吸着は阻害され得る。このように、 SiO_2 とアルミナとの組合わせは、選択的吸着に対し適当である。

【 0 0 2 3 】

また、シリコン（S i）の等電点は添加されている不純物の種類や濃度によって異なるが、たとえば、一般的な n 型 S i の等電点は 3. 5 ～ 4 程度であり、それより低い p H において n 型 S i 表面は正に帯電し、それより高い p H において負に帯電する。また、一般的な p 型 S i の等電点は 5 ～ 6 程度である。したがって、図 1 に示す装置において、第 1 の固体 1 1 を n 型 S i 基板とし、第 2 の固体（アイランド）1 2 を S i 基板上に形成されたアルミナとすれば、タンパク質を含み、かつ 6 ～ 8 の p H（タンパク質の等電点とアルミナの等電点の間の値）を有する溶液 1 4 中で、n 型 S i とタンパク質は負に、アルミナは正に帯電する。したがって、溶液中のタンパク質は、正に帯電するアルミナに選択的に吸着する一方で、負に帯電する S i 上への吸着は阻害され得る。このように、シリコンとアルミナとの組み合わせも、タンパク質分子の選択的吸着に対し適当である。

【 0 0 2 4 】

本発明による装置において、第 1 の固体表面と第 2 の固体表面との組み合わせは、任意であるが、結晶化すべき分子の等電点が、第 1 の固体表面の等電点と第 2 の固体表面の等電点との間にくるよう、当該組み合わせを選択することが望ましい。すなわち、図 3 および図 4 に示すように、結晶化すべき分子の p H - 表面電位曲線が、第 1 の固体表面と第 2 の固体表面の p H - 表面電位曲線の間にくることが望ましい。

【 0 0 2 5 】

本発明による装置に使用される好ましい半導体には、シリコン、ガリウム・ヒ素（G a A s）、ガリウム・リン（G a P）などがある。好ましい半導体化合物には、酸化シリコン、窒化シリコンなどがあり、好ましい金属化合物には、酸化アルミニウム（ α -A l₂O₃、 γ -A l₂O₃）、酸化チタン、酸化銅などの金属酸化物や、窒化アルミニウム、窒化チタン、窒化タングステン、窒化タンタル、T a S i N、W S i N などの金属窒化物や、水酸化アルミニウム、水酸化マグネシウムなどの金属水酸化物などがある。好ましい組み合わせには、シリコン-アルミナ、酸化シリコン-アルミナ、窒化シリコン（等電点は 4 ～ 5 程度）-アルミナ、酸化シリコン-酸化チタン（等電点は 5 ～ 6. 5 程度）、シリコン-酸化チ

タン、酸化チタン-アルミナなどがある。

【0026】

第1の固体表面およびアイランドは、同一の基板上に形成することが好ましく、半導体基板上に形成することがより好ましく、特に、シリコン基板上に形成することが好ましい。たとえば、シリコン基板表面の所定の領域にのみアルミナを形成することで、シリコン-アルミナの組合わせが形成できる。また、シリコン基板表面全体にシリコン酸化膜 (SiO_2 膜) を形成し、その SiO_2 膜表面の所定の領域にのみアルミナを形成することで、酸化シリコン-アルミナの組合わせが形成できる。 SiO_2 膜に変えてシリコン窒化膜 (Si_3N_4 膜) を形成すれば、同様に窒化シリコン-アルミナの組合わせが形成でき、アルミナの代わりに酸化チタンを形成すれば、シリコン-酸化チタンや酸化シリコン-酸化チタンの組合わせを形成できる。

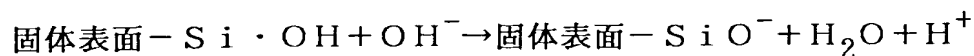
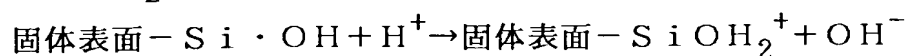
【0027】

半導体基板、より好ましくはシリコン基板を用いることで、CVD、ホトリソグラフィ、エッチング等の通常の半導体集積回路の製造と同様な手法によって、容易に複数種の固体表面を有する装置を作製できる。すなわち、CVD技術を用いてシリコン基板上に所望の材料の膜を成膜し、必要に応じてその上に異なる材料の膜を成膜して多層構造とし、ホトリソグラフィ技術を用いて所望の形状のマスクを形成し、エッチング技術を用いてマスクを施した領域以外を除去して下地を露出させれば、各種の組合わせの複数種の固体表面を有する装置を作製できる。たとえば、シリコン基板の表面にアルミナ膜を成膜し、所定の領域のみを残して当該アルミナ膜をエッチングにより除去してシリコン基板の表面を露出させれば、シリコン-アルミナの組合わせが形成できる。また、シリコン基板表面にシリコン酸化膜を成膜し、さらにその上にアルミナ膜を成膜し、所定の領域のみを残してアルミナ膜をエッチングにより除去しシリコン酸化膜を露出させれば、酸化シリコン-アルミナの組合わせが形成できる。このように、シリコン基板上に成膜する膜の材料を変えれば、容易に各種の組合わせが形成できる。

【0028】

金属もしくは半導体の酸化物または水酸化物の表面は、水と接すると水和を起

こし、水酸基を生成させる。この水酸基の解離により、酸化物または水酸化物の表面は、水溶液の pH に応じて表面電位（ゼータ電位）を生じさせる。たとえば、 SiO_2 では次のような解離が生じる。



したがって、酸化物または水酸化物の表面は、低い pH で、プロトン付加により正の電位を帯び、高い pH で、OH 基からのプロトンの引き抜きにより負の電位を帯びる。一般に、酸化物または水酸化物は、見かけ上の電位がゼロになる点（等電位点）を有し、この点より高い pH では、負の表面電位を、この点より低い pH では、正の表面電位を有する。したがって、異なる等電位点を有する酸化物または水酸化物の組合わせを選択し、本発明に好ましく用いることができる。

【0029】

本発明による装置において、アイランド部は任意の形状とすることができる。たとえば、アイランド部は、図 5（a）または（b）に示すように、断面が略矩形の細長い直方体または断面が略台形の細長い角錐台の形状を有してもよいし、図 5（c）に示すように、略円筒形でもよいし、図 5（d）に示すような角柱形でもよい。いずれの場合も、アイランド部において有機分子を吸着すべき表面 32 a～d は、その上で有機分子の結晶がはみ出して成長するような幅 d を有する。すなわち幅 d は得るべき結晶の径よりも小さい。また、図 6（a）に示すように同じ形状のアイランドを複数設けてもよいし、図 6（b）に示すように、制限された範囲において幅の異なる複数種のアイランドを設けてもよい。目的とする有機分子の性質により、また溶液の pH や濃度や温度などにより、結晶化に必要な吸着力と成長した結晶の取り出し易さとの兼ね合いで、適切なアイランド幅が異なることも考えられるが、幅の異なる複数種のアイランドを用意することにより、そのいずれかのアイランドで良好に結晶成長が行われ、かつ成長した結晶を容易に取り出せることが期待できる。

【0030】

また、本発明による装置において、結晶化を抑制すべき固体表面（第 1 の表面とする）と結晶化を促進すべきアイランド表面（第 2 の表面とする）の配置パタ

ーンは、任意である。たとえば、図 7 (a) に示すように、第 2 の表面 4 2 a が第 1 の表面 4 1 a に囲まれるような配置は好ましく使用される。この場合、第 1 の表面は、第 2 の表面より顕著に広い。図 7 (a) に示すもののほか、図 7 (b) に示すように、第 1 の表面 4 1 b に対し、所定の幅を有する複数の第 2 の表面 4 2 b を所定の間隔をあけて配置してもよいし、図 7 (c) に示すように、第 1 の表面 4 1 c に対し、所定の形状および面積を有する第 2 の表面 4 2 c を、所定の間隔をあけてマトリクス状に配置してもよい。

【 0 0 3 1 】

また、図 8 に示すように第 1 の表面 6 1 に対し、これと異なる複数種の第 2 の表面 6 2 および 6 3 を配置することができる。表面 6 2 および 6 3 は、所定の pH を有する溶液に対し、異なる電位を有する。たとえば、表面 6 1 は酸化シリコンとし、表面 6 2 はアルミナとし、表面 6 3 は酸化チタンとすることができる。結晶化すべき特定の有機分子は、表面 6 2 および 6 3 のいずれかにより強く吸着され得る。有機分子をより強く吸着させ得る表面の最適な材料は、目的とする有機分子により異なることが考えられる。図 8 に示すように第 2 の表面を複数種形成することにより、1 つの装置で各種の有機分子の結晶化に利用できる装置を提供できる。図 8 の装置では、第 2 の表面は 2 種類であるが、3 種以上形成することもできる。このような装置も同様に半導体集積回路の一般的な製造方法を用いて容易に作製可能である。たとえば、シリコン基板上に SiO_2 膜、 TiO_2 膜、 Al_2O_3 膜を順に成膜、積層して、表面 6 2 および 6 3 の領域を残して Al_2O_3 膜を除去して下地の TiO_2 膜を露出させ、その後、露出した TiO_2 膜のうち表面 6 3 の領域を残して TiO_2 膜を除去して SiO_2 膜を露出させればよい。また、特定の有機分子の結晶化のため、図 9 に示すように、複数の装置を提供してもよい。装置 7 1、7 2 および 7 3 は、それぞれ、異なる表面 7 1 a、7 2 a および 7 3 a を有する。装置 7 1 ~ 7 3 のいずれかにおいて、結晶化がより好ましく進行し得る。同時に使用される表面の種類を多くすることによって、より多くの有機分子の結晶化に対応することができる。

【 0 0 3 2 】

図 1 0 (a) および図 1 0 (b) は、本発明による装置の一例を示す。装置 8

0において、シリコン基板81上にアルミナ(Al_2O_3)からなる表面84aを与えるアイランド84が形成されている。アイランド84において、表面84aを支持する部分84bは、シリコンからなる。アイランド84の周りでは、シリコン基板81自体の表面が露出している。基板81上には、溶液85を保持するため、囲い壁86が設けられている。囲い壁86は、溶液85の流れを堰きとめるための部材である。囲い壁86により溶液を保持するための部分が形成される。溶液85が7~8のpHを有するとき、シリコン基板81の表面は負に帯電し、アルミナの表面84aは正に帯電する。一方、溶液85中に存在する結晶化すべき有機分子が4~7の等電点を有する場合、当該分子は、通常、負に帯電する。したがって、溶液85中の分子は、正に帯電するの表面84aに選択的に吸着され、その結果、表面84a上で結晶成長が起こり得る。一方、有機分子のシリコン基板81上への吸着は阻害される。また、アイランドの表面84aの幅dは、図2(a)に示すように、得られる結晶の径よりも小さいものであり、たとえば、10~200 μm である。一方、このような装置の代わりに、シリコン基板上に酸化シリコン(SiO_2)膜を形成し、その上にアルミナのアイランドを形成し、酸化シリコンの表面を吸着阻害用の表面として使用してもよい。また、アルミナの代わりに他の金属酸化物、金属窒化物または金属水酸化物を使用してもよい。さらに、シリコン以外の半導体、または金属の基板を使用してもよい。

【0033】

図10に示す装置のアイランドは、たとえば図11(a)~図11(d)に示すような工程によって作製できる。まず、図11(a)に示すように、シリコン基板81を準備する。次いで、図11(b)に示すようにシリコン基板81上に Al_2O_3 膜94を形成する。この膜は、蒸着、スパッタリング等によって形成できる。通常のプロトリソグラフィーに従って、図11(c)に示すようなレジストパターン95を形成した後、レジストで覆われていない部分をエッチングし、レジストを除去することにより、図11(d)に示すようなアイランド84が得られる。アイランド84の頂部には Al_2O_3 の表面84aが与えられる。得られた構造物に囲い壁をもたらす部材を結合すれば、図10(a)および(b)に示すような装置が得られる。このとき、囲い壁は、溶液中の有機分子の吸着を阻害し

得る材料、たとえば低い等電点を有するガラス等で形成することが望ましい。ただし、有機分子を吸着させる固体表面（アイランド）と囲い壁との距離が溶液中の有機分子の拡散距離（有機分子が溶液中で移動し得る距離）よりも十分に長い場合は、この限りではなく、他の材料で囲い壁を形成しても問題ない。

【0034】

また、図12（a）に示すように、シリコン基板81上に酸化シリコン（ SiO_2 ）膜82を形成してもよい。次いで、図12（b）に示すように酸化シリコン膜82上にアルミナ膜94を形成する。同様にレジストパターン95を形成した（図12（c））後、エッチングを行い、アイランド96を得る（図12（d））。アイランド96において、頂部のアルミナ膜94は、酸化シリコン膜82に支持される。また、上記工程において、シリコン基板上に形成する膜の材料を変えることにより、種々の組合わせの固体表面を有する装置を得ることができる。

【0035】

本発明による装置は、結晶化すべき有機分子を含む溶液のpHを測定するための手段を含むことができる。上述したように固体表面および分離すべき有機分子の表面電位または実効表面電荷は、溶液のpHに左右されるため、分離または結晶化の操作において、溶液のpHをモニタすることは、有意義である。pH測定手段には、通常のpHメーター、イオン感應性電界効果型トランジスタ（ISFET）と基準電極を組合わせた従来型のpHセンサー等を用いることができる。このpH測定手段は、半導体層と、半導体層上に形成される絶縁層と、溶液を絶縁層上で保持するための囲い壁と、溶液に接触するように囲い壁に設けられる金属電極とを備えることができる。本発明による装置において、固体表面およびpH測定手段は、同一の半導体基板上に形成することができる。pH測定手段における半導体層は、半導体基板の一部とすることができ、また、第1の固体表面は、当該半導体基板の表面または当該半導体基板表面に形成された半導体化合物膜もしくは金属化合物膜の表面とすることができ、第2の固体表面は、第1の表面上の所定の領域に形成される半導体化合物のアイランドまたは金属化合物のアイランドの表面とすることができる。第1の表面および第2の表面は、溶液と接触

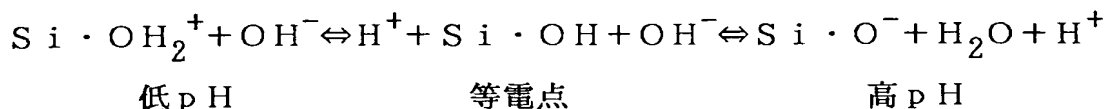
するとき、互いに異なる表面電位またはゼータ電位を有する。第 1 の表面はシリコンまたはシリコン酸化膜で形成することができる。本発明による装置において、第 1 および第 2 の固体表面を与える材料は、積層構造を有してもよい。この積層構造において、上層に位置する材料は、下層に位置する材料上の複数の位置に、間隔をあけて設けられていることが好ましい。

【 0 0 3 6 】

一方、pH測定手段として、図 1 3 に示すような装置を用いてもよい。pH測定装置 1 0 0 において、n 型シリコン基板 1 0 1 上には SiO_2 膜 1 0 2 が形成されている。基板 1 0 1 上には溶液保持部 1 1 0 が設けられる。溶液保持部 1 1 0 は、溶液 1 0 5 の流れを堰きとめる囲い壁 1 0 6 および SiO_2 膜 1 0 2 から構成される。囲い壁 1 0 6 上には金属電極 1 0 7 が設けられる。金属電極 1 0 7 は、 SiO_2 膜 1 0 2 の方に延びていて、溶液保持部 1 1 0 内に保持される溶液と接触するように配置される。シリコン基板 1 0 1 の裏面 (SiO_2 膜 1 0 2 が設けられた面と対向する面) には、端子電極 1 0 8 が設けられる。

【 0 0 3 7 】

酸化物の表面は、上述したように水和反応を起こして、水酸基を生成させる。その水酸基の解離によって酸化物表面に電荷が生じる。したがって、酸化物の表面には、溶液の pH に応じた表面電位が発生する。たとえば、 SiO_2 の場合、以下のような解離がおこり、その表面電位は pH によって変化する。



他の酸化物でも同様な機構により表面電位が生じ、酸化物の種類に応じて等電点や発生する電位の値は異なる。なお、 SiO_2 の等電点はおよそ 1.8 ~ 2.8 である。また、詳細な機構は分からないが、窒化物の表面にも酸化物と同様に水溶液中でその水溶液の pH に応じた電位が発生する。たとえば、 Si_3N_4 の場合は等電点がおよそ 4 ~ 5 程度であって、それより低い pH で正の表面電位を、それより高い pH で負の表面電位を帯びる。このため、絶縁層として SiO_2 膜のかわりに Si_3N_4 膜等の窒化物膜を用いてもよい。

【 0 0 3 8 】

したがって、図 1 3 に示す装置 1 0 0 において、 SiO_2 膜 1 0 2 が露出した溶液保持部 1 1 0 に水溶液を入れると、 SiO_2 膜 1 0 2 の表面にその水溶液の pH に応じた電位が発生する。この電位によって、酸化膜を介して設けられるシリコン基板表面のキャリア濃度が変化する。したがって、シリコン基板 1 0 1 の溶液 1 0 5 に近い部分に形成される空乏層 1 0 9 の容量が変化する（空乏層の幅が変化する）。したがって、MOS (MIS) に相当する構造を有する装置 1 0 0 において、金属電極 1 0 7 と端子電極 1 0 8 との間の容量電圧特性（高周波特性）は、溶液 1 0 5 の pH に応じて変化する。この変化を、図 1 4 に示す。図 1 4 は、pH の異なる 2 種の溶液に関して容量電圧特性を示している。容量電圧特性は、図に示すように pH に応じて電圧軸方向に変化する。

【 0 0 3 9 】

あらかじめ、図 1 3 に示す pH 測定装置を用いて、測定周波数 1 MHz 程度で、pH の分かっている種々の溶液の容量電圧特性を測定し、pH 値とフラットバンド電位 (V_{FB}) との関係を得ることができる。pH 値とフラットバンド電位 (V_{FB}) は、たとえば図 1 5 に示すような関係を有する。この関係に基づいて、未知の溶液の pH が求められる。すなわち、pH 測定装置 1 0 0 を C-V メーターおよび C-V レコーダーに接続する。次いで、溶液保持部 1 1 0 に測定すべき溶液を入れ、電極 1 0 7 と 1 0 8 との間の C-V 特性を測定し、 V_{FB} を求める。得られた V_{FB} と、予め得られた pH 値とフラットバンド電位 (V_{FB}) との関係から、当該溶液の pH が決定される。

【 0 0 4 0 】

この pH 測定装置において、n 型 Si 基板の代わりに p 型 Si 基板を用いてもよいし、他の半導体基板、たとえば、Ge 基板や GaAs 等の化合物半導体基板を用いてもよい。また、 SiO_2 膜の代わりに他の酸化物膜たとえば Al_2O_3 膜、 TiO_2 膜を用いてもよいし、 Si_3N_4 等の窒化物膜を用いてもよい。絶縁層の厚みは、たとえば $100 \text{ \AA} \sim 1 \mu\text{m}$ であり、好ましくは $500 \text{ \AA} \sim 3000 \text{ \AA}$ である。電極用の材料には、Pt、Pd、Au 等を用いることができる。

【 0 0 4 1 】

この pH 測定装置は、極めて単純な構造 (MOS (MIS) 構造) を有し、通

常の半導体加工技術（リソグラフィー、CVD、エッチング等）を用いて簡単に製作できる。当該装置の溶液保持部にピペットなどで溶液を滴下し、数 μ l～数十 μ lの微量の溶液についてpHを測定できる。この装置は、シリコン基板上に作製することができ、したがって、本発明による分離装置と同じ基板上に作り込むことができる。

【0042】

【実施例】

牛脾臓製カタラーゼ（Catalase from Bovine Pancreas）懸濁液を同量のpH 8.0のリン酸塩緩衝液に溶解した。得られた溶液をシリコン結晶を使用した装置の表面に滴下して、シッティングドロップ法と類似の方法により結晶化を行った。結晶成長用装置には、以下の2種類を用いた。

【0043】

（1）約 $20\Omega \cdot \text{cm}$ の比抵抗を有するP型シリコン基板表面に、約 $1\mu\text{m}$ の厚みのアルミナ皮膜を形成した。その後、図11に示すように選択的エッチングを行い、空間的に電荷特性の異なる領域を形成した。エッチングにより得られたアイランドのアルミナ層の幅は約 $50\mu\text{m}$ であった。アイランドが形成されたシリコン基板を縦 15mm 、横 15mm のサイズに切断し、結晶成長用装置を得た。

【0044】

（2）エッチングにより得られるアイランドのアルミナ層の幅を約 1mm とした以外は、（1）と同様にして結晶成長用装置を得た。

【0045】

（1）および（2）の装置において、シリコン表面およびアイランドのアルミナ表面を覆うように、カタラーゼを含む液 $30\mu\text{l}$ を滴下し、 5°C の冷暗所で保管した。冷暗所に1週間保管した後、装置を顕微鏡で観察した。両方の装置のアルミナ表面に、カタラーゼの結晶が析出しているのを確認した。観察された結晶の平均径は約 0.1mm であった。

【0046】

それぞれの装置においてアルミナ表面上で成長した結晶を、溶液とともにピペ

ット内に吸い取り、次いでピペットから溶液を直径約1 mmのガラス製キャピラリーに移して封印しようとした。(1)の装置では、結晶を容易にピペットに吸い込むことができ、キャピラリーに結晶を封入することができた。一方、(2)の装置では、結晶をピペットに吸い込むことがそれほど容易ではなく、無理に結晶をピペットに吸い込もうとすると、結晶が破壊されることがあった。

【0047】

また、図16および図17に示すような装置を作製した。装置130は、シリコン基板131を含む基台部141と、それに接合されたパイレックスガラス製の溶液保持プレート(囲い壁)142とを有する。基台部141のサイズは、15 mm×15 mmである。基台部141とプレート142とによって、2つの結晶成長用セル132aおよび132b、1つの沈殿剤用セル133、ならびに1つのpHモニター用セル134が形成される。プレート142のサイズは、12 mm×12 mmであり、高さは0.5 mmである。シリコン基板131の表面は、シリコン酸化膜135で被覆されている。セル132a、132bおよび134は、直径約4 mmの円筒形または円錐台形であり、セル133は、5.5 mm×5.5 mmの角柱形である。結晶成長用セル132aおよび132b、ならびにpHモニター用セル134内には、シリコン酸化膜135上にアルミナのアイランド136が複数形成されている。アイランド136は、図19(a)および図19(b)に示すような線状であり、その幅は約50 μmである。また、隣り合うアイランド間の距離は、約0.2 mm~1 mmである。セル内の場所またはセルによって、このアイランド間の間隔は、異なっている。たとえば、セル132aには、図19(a)に示すようなパターンのアイランドが形成され、セル132bには、図19(b)に示すようなパターンのアイランドが形成される。pHモニター用セル134を形成するプレート142a上には、電極144が形成され、シリコン基板131の裏面にも電極145が形成される。図18に示すように電極144は、Ti層144aおよびPt層144bを有する二層構造となっている。電極144上には、外部との接続用の端子146が設けられる。シリコン基板131、シリコン酸化膜135、電極144、および電極145によりpHセンサー部が構成される。図16および図17に示す装置において、pHモ

ニター用セル134内のアイランド136は必ずしも必要でない。さらに、シリコン基板131の裏面で結晶成長用セルに対向する位置には、必要に応じてセル132aおよび132bを加熱するための発熱素子147が設けられる。発熱素子は、溶液を加熱し、結晶の成長を制御する。

【0048】

図20は、好ましい発熱素子の一具体例を示す。発熱素子164において、基材161上には、パッド165aおよび165bが形成される。パッド165aと165bとの間には、コンパクトに折り畳まれた電熱線167が設けられる。パッド165aおよび165bならびに電熱線167は、基材161上に形成された薄膜である。基材161には、シリコン基板やガラス基板等を用いることができる。パッド165aおよび165bは、アルミニウム、銅等の良導体からなる薄膜であり、電熱線167は、Cr、Fe-Cr-Al系合金、Ni-Cr系合金等の電熱材料からなる薄膜である。電熱線167の隣には、温度測定用の抵抗線168が設けられる。抵抗線168の両端には、パッド165cおよび165dが設けられる。パッド165cおよび165dは、アルミニウム、銅などの良導体からなる薄膜であり、抵抗線168は、Cr、銅マンガン合金、銅ニッケル合金などの抵抗材料からなる薄膜である。厳密な温度管理が必要な場合、図20に示すように電熱線の隣に温度測定用の抵抗線を設けることが好ましい。たとえば、電熱線167の厚みは、 $0.1\mu\text{m}\sim 1.0\mu\text{m}$ であり、パッド165a \sim 165dの厚みは、 $0.5\mu\text{m}\sim 2.0\mu\text{m}$ である。電熱線167の幅は、たとえば $50\mu\text{m}\sim 100\mu\text{m}$ である。一方、発熱素子の温度を正確に測定するため、抵抗線168の熱容量はできるだけ小さくすることが望ましい。したがって、抵抗線168のサイズは、必要な範囲でできるだけ小さくすることが望ましい。たとえば抵抗線168の幅は、 $10\mu\text{m}$ 以下が好ましく、たとえば $1\sim 10\mu\text{m}$ である。抵抗線168の厚みは、 $0.3\mu\text{m}$ 以下が好ましく、たとえば $0.1\sim 0.3\mu\text{m}$ である。

【0049】

図16に示す装置の基台部は、半導体装置の一般的な製造プロセスを使用して、シリコンウェーハ上に一度に多数作製することができる。たとえば、図21（

a) に示すように、まず、シリコンウェーハ 1 8 1 の表面に熱酸化によって約 2 0 0 n m の厚みのシリコン酸化膜 1 8 2 を形成する。次に、シリコン酸化膜 1 8 2 上に、スパッタリング、C V D 等によりアルミナ膜を形成するか、スパッタリングまたは蒸着により形成したアルミニウム膜を酸化して、図 2 1 (b) に示すように、厚み約 3 ~ 5 μ m のアルミナ膜 1 8 4 を形成する。次いで、図 2 1 (c) に示すように、通常のホテルソグラフィーに従ってアルミナ膜 1 8 4 上にレジストパターン 1 8 5 を形成する。通常用いられレジストをマスクとするエッチングにより、アイランド部のみを残してアルミナ膜を除去する。かくして、図 2 1 (d) に示すように、シリコン酸化膜 1 8 2 上にアルミナのアイランド 1 8 4 ' が形成される。その後、シリコンウェーハを切断（スクライビング）し、得られたチップに電極 1 8 5 および必要に応じ発熱素子 1 8 7 を設けて、多数の基台部を得る（図 2 1 (e) ）。

【 0 0 5 0 】

溶液保持プレートも、一般的なエッチング技術およびスパッタリング技術を用いて、たとえば図 2 2 (a) ~ 図 2 2 (f) に示すように作製される。まず、図 2 2 (a) に示すように、パイレックスガラス板 1 9 1 の表面に所定のパターンでレジストマスク 1 9 2 を形成する。次いで、図 2 2 (b) に示すように、フッ酸によるウェットエッチングまたはダイヤモンドブラスト法を行なって貫通孔 1 9 3 a および 1 9 3 b をガラス板 1 9 1 に形成する。次に、p H モニタ用セルとなるべき貫通孔 1 9 3 a 以外の場所を S U S 板のハードマスク 1 9 4 a で覆い、スパッタリングによって T i / P t 膜 1 9 5 を形成する（図 2 2 (c) ）。その後、必要な部分をハードマスク 1 9 4 b で覆い、スパッタリングにより接続用の A u 端子 1 9 6 を形成する（図 2 2 (d) ）。かくして、図 2 2 (e) に示すような電極部 1 9 7 を有する溶液保持プレート 1 9 8 が得られる。得られたプレートを、図 2 1 (a) ~ (e) に示すプロセスにより得られた基台部に、陽極接合などにより結合し、図 1 5 に示す装置が得られる（図 2 2 (f) ）。

【 0 0 5 1 】

図 1 6 に示す装置 1 3 0 において、次のような方法により、タンパク質の結晶を調製する。まず、結晶成長用セルと p H モニター用セルに、目的とするタンバ

ク質が溶解した溶液（母液）をたとえば約 $30 \mu\text{l}$ 滴下する。溶液中のタンパク質の濃度は $10 \sim 50 \text{ mg/ml}$ 程度である。最適な濃度は目的とするタンパク質の種類によって異なる。未知のタンパク質の結晶化を行なう場合、濃度を変えた複数種の溶液を調製し、それらについて、図 16 に示す装置を複数用意し、同時に結晶成長を行なえばよい。このとき、溶液の pH は、タンパク質およびシリコン酸化物の等電位点より高く、アルミナの等電位点よりも低くなるように調整する。溶液の pH の調整は、緩衝溶液の添加により行なう。シリコン酸化物の等電位点は約 2 であり、アルミナのそれは約 9 である。したがって、たとえば、目的とするタンパク質の等電位点が約 7 である場合、溶液の pH を約 8 に調整する。こうすれば、タンパク質およびシリコン酸化膜の表面電位は負となり、アルミナの表面電位は正となる。溶液の最適な pH も、目的とするタンパク質により異なる。したがって、pH を変えた複数種の溶液を調製し、これらについて同時に結晶化を行なうことが好ましい。また、沈殿剤用セルに沈殿剤を入れる。沈殿剤には、たとえば 1 M の NaCl 溶液 2 ml と pH が 4.6 の標準緩衝溶液 2 ml とを混合したものをを用いる。

【0052】

図 23 に示すように、装置 130 のセルを透明なガラスの蓋 200 で密封し、冷暗所に約 100 時間保管する。タンパク質分子は、静電的な引力により、アルミナのアイランド部に集められ、固定される。アイランド部でタンパク質の結晶核が形成され、結晶成長が進む。結晶成長の様子は、透明な蓋の上から顕微鏡により観察される。その際、図 23 に示すように、pH モニター用セルの電極に C-V メーター 201 を接続し、X-Y レコーダー 202 で C-V 特性を測定する。これにより、結晶成長中の溶液の pH がモニターされる。溶液の pH は、事前に調整してあるものの、結晶成長中に変化し得る。タンパク質の結晶性は、溶液の pH の微妙な変化に影響され得る。したがって、実際に結晶が成長していく過程において pH の微妙な変化を把握することは重要である。

【0053】

本発明の装置は、沈殿剤とともに密封してもよい。沈殿剤は別の容器に入れて結晶成長用装置と並べて置けばよい。pH モニタは、必ずしも必要ではないが、

同一の基板上に結晶成長用セル、pHモニター用セル、沈殿剤用セルを作製し、1チップとした方が、使い勝手がよく好ましい。このような1チップ化した装置は、前述のように半導体装置の一般的な製造プロセスを用いて容易に作製できる。

【0054】

また、より多い数のセルを有する装置を用いれば、より多くの条件下（含有するタンパク質の濃度やpHなどの条件を変えた複数種の母液）で、同時に結晶化の実験を行なうことができる。たとえば、図24に示す装置は、この要求に答えることができる。装置210は、9つの結晶成長用セル211～219、1つのpHモニター用セル221および2つの沈殿剤用セル231および232を有する。タンパク質の濃度を変えた複数種の母液を用いて、結晶化を行うような場合には、装置210のように複数の結晶成長用セルに対してpHモニター用セルは1つあればよいが、pHを変えた複数種の母液を用いる場合には、結晶成長用セルと同数のpHモニター用セルを有することができる。また、pHをモニターする必要がない場合は、沈殿剤用セルを除いて、すべてを結晶成長用セルにすることもできる。また、各セルに異なる幅を有する複数のアイランドを設けてもよいし、セルごとにアイランドの幅を変えてもよい。

【0055】

【発明の効果】

本発明によれば、タンパク質等の有機分子の結晶を固体表面上に選択的に成長させることができ、しかも、成長した結晶を容易に取出すことができる。また本発明によれば、微結晶の大量生成を抑制または制御することができ、X線構造解析を可能にし得る大型の結晶を得ることができる。さらに本発明によれば、多数の固体表面を結晶化に用いることによって、あらゆる種類の有機分子の結晶化に対応することができる。また、本発明では、極微量の試料について結晶化を行なうことができる。

【0056】

本発明は、製薬産業や食品産業等において、種々の高分子化合物、特に高分子電解質を精製または結晶化するために用いることができる。本発明は特に、酵素

および膜タンパク質等のタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、ポリサッカライド、核酸、ならびにこれらの複合体および誘導体等を精製または結晶化させるため好ましく適用される。特に本発明は、生体高分子の精製または結晶化のため好ましく適用される。また本発明の装置は、生体高分子等を選択的に吸着および固定化することが可能なため、バイオセンサ、バイオセンサによる各種生体組織および生体物質の測定装置への応用等が可能である。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明による装置の一具体例を示す概略断面図である。

【図 2】 (a) および (b) は、アイランドに与えられる吸着表面の幅が異なる装置をそれぞれ示す概略断面図である。

【図 3】 溶液中の 2 種の固体表面およびタンパク質の表面電荷が、溶液の pH によって変化する様子を示す図である。

【図 4】 溶液中の 2 種の固体表面およびタンパク質の表面電荷が、溶液の pH によって変化する様子を示す図である。

【図 5】 (a) ~ (d) は、種々の形状のアイランドを概略的に示す斜視図である。

【図 6】 (a) および (b) は、複数のアイランドが設けられた装置の部分を示す斜視図である。

【図 7】 (a) ~ (c) は、本発明による装置において、複数の固体表面が配置されるパターンの例を示す平面図である。

【図 8】 本発明に従い、複数の好ましい吸着表面を有する装置の一例を示す平面図である。

【図 9】 本発明に従い、複数の装置で条件の異なる結晶化を行なうことを示す図である。

【図 10】 本発明による装置のもう一つの例を示す (a) 断面図および (b) 平面図である。

【図 11】 (a) ~ (d) は、図 10 (a) および (b) に示す装置を製造する方法を説明する概略断面図である。

【図 12】 (a) ~ (d) は、本発明による装置を製造する他の方法を説

明する概略断面図である。

【図 1 3】 本発明の装置に設けられる p H センサーの一例を示す概略断面図である。

【図 1 4】 図 1 2 に示す p H センサーで測定される容量電圧特性の例を示す図である。

【図 1 5】 図 1 2 に示す p H センサーで測定される容量電圧特性から求められるフラットバンド値と溶液の p H との関係を示す図である。

【図 1 6】 本発明による装置の他の例を示す斜視図である。

【図 1 7】 図 1 5 に示す装置の断面図である。

【図 1 8】 図 1 5 に示す装置における電極を拡大した断面図である。

【図 1 9】 (a) および (b) は、図 1 5 に示す装置において結晶成長用セルに設けられるアイランドのパターンを拡大して示す平面図である。

【図 2 0】 図 1 5 に示す装置が有する発熱素子の構造を拡大して示す斜視図である。

【図 2 1】 (a) ~ (e) は、図 1 5 に示す装置の基台部を製造する方法を示す概略断面図である。

【図 2 2】 (a) ~ (f) は、図 1 5 に示す装置の溶液保持プレートを製造する方法を示す概略断面図である。

【図 2 3】 図 1 5 に示す装置において p H を測定する流れを示す模式図である。

【図 2 4】 本発明による装置のさらなる例を示す平面図である。

【図 2 5】 (a) および (b) は、従来の結晶成長法を示す模式図である。

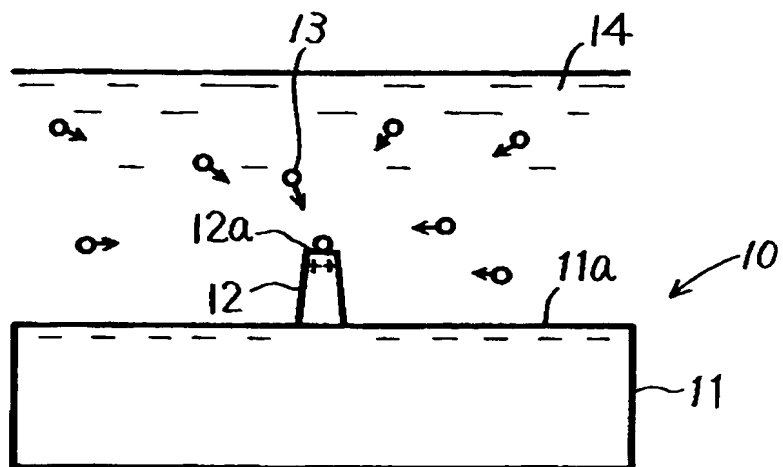
。

【符号の説明】

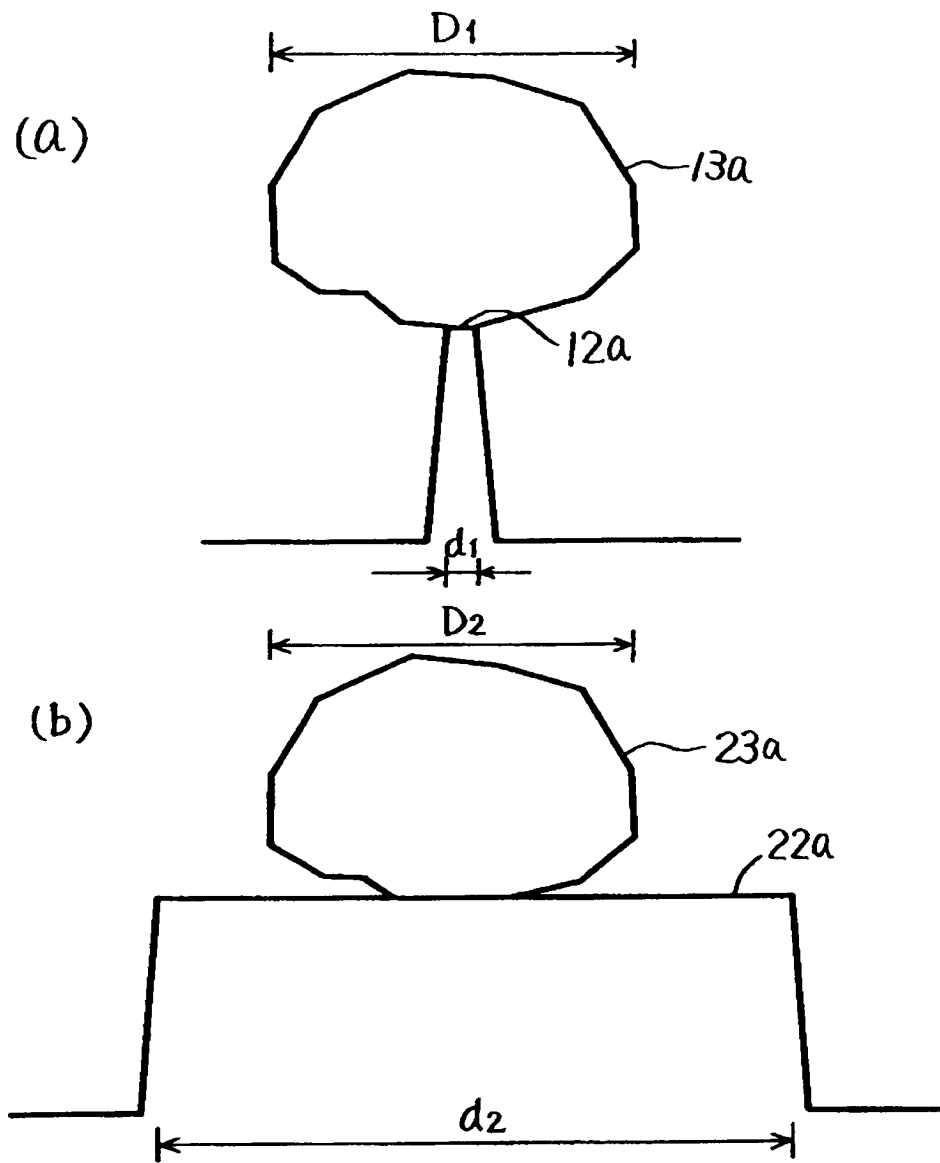
1 1 第 1 の固体, 1 1 a 第 1 の表面, 1 2 第 2 の固体, 1 2 a 第 2 の表面, 1 3 有機分子, 1 4 溶液。

【書類名】 図面

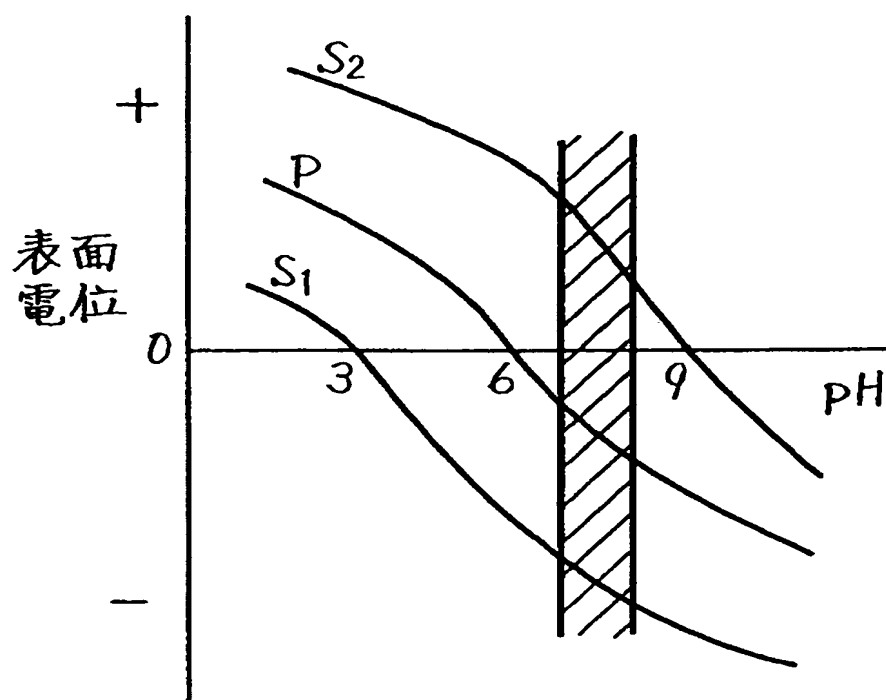
【図 1】



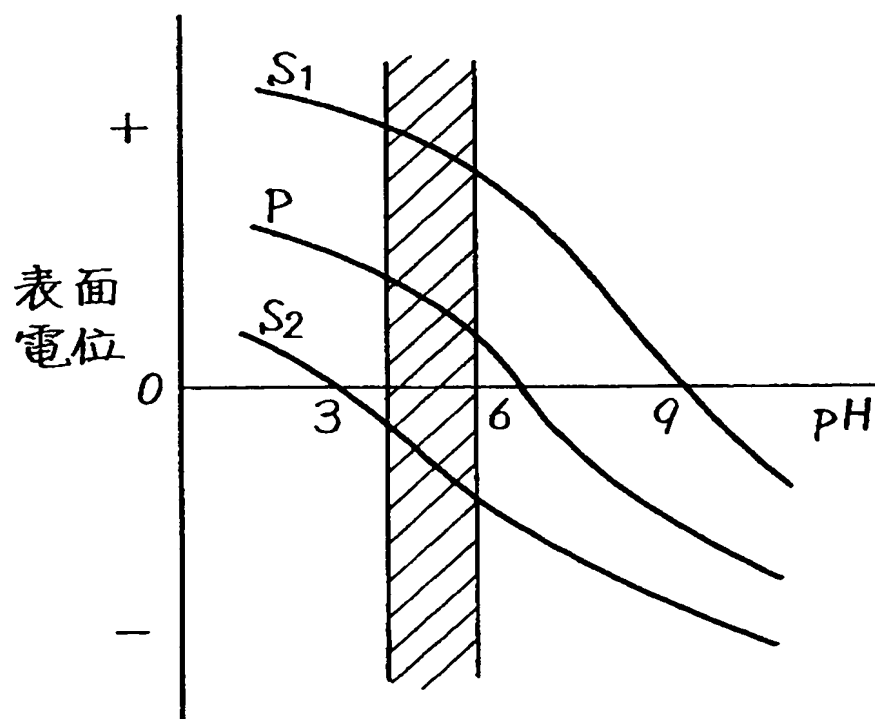
【図 2】



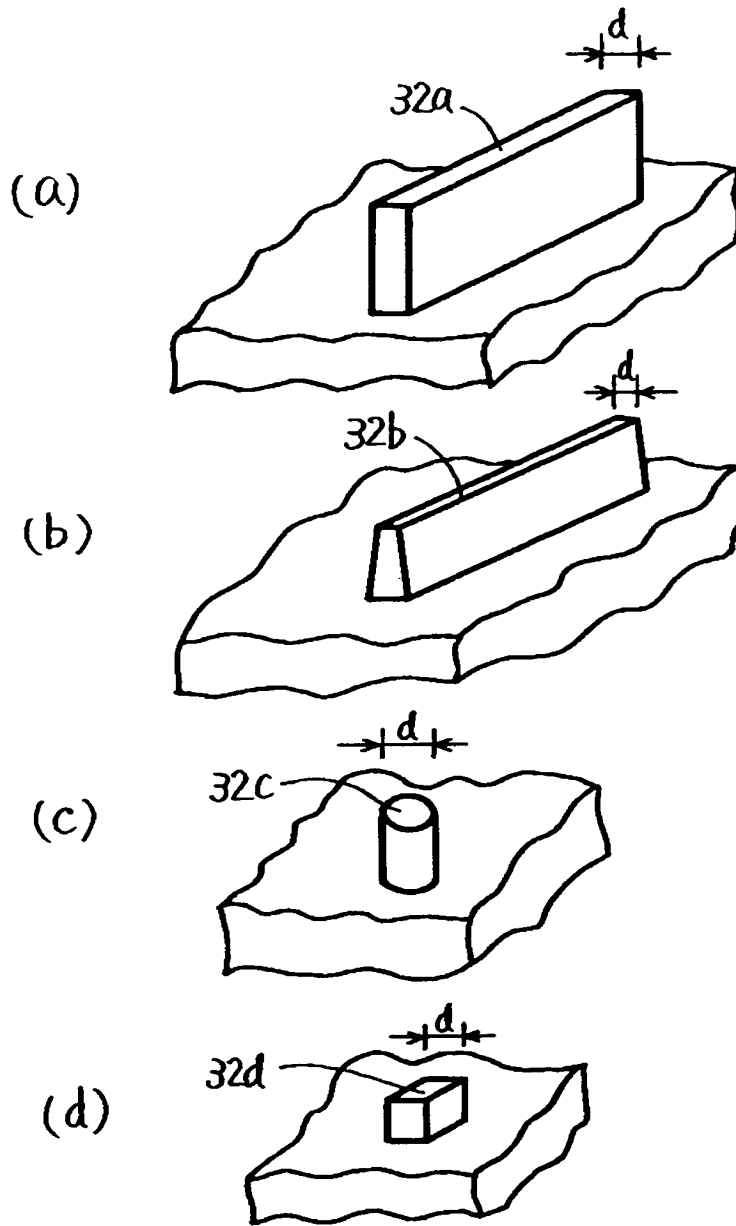
【図3】



【図4】

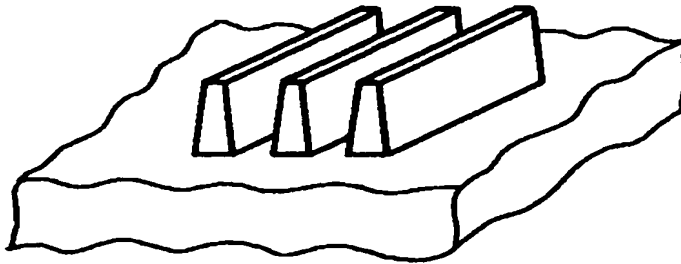


【図5】

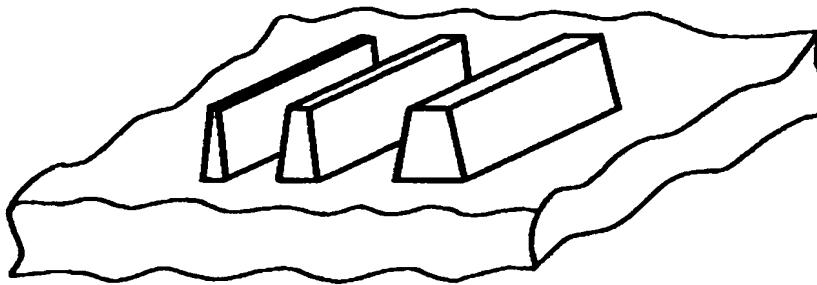


【図 6】

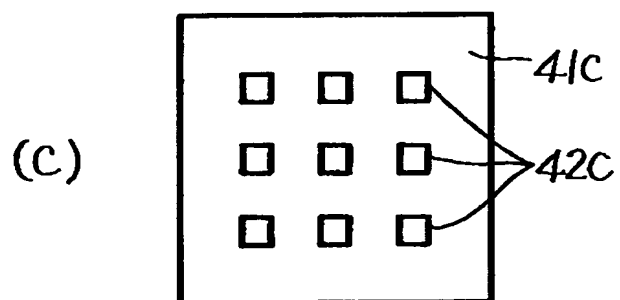
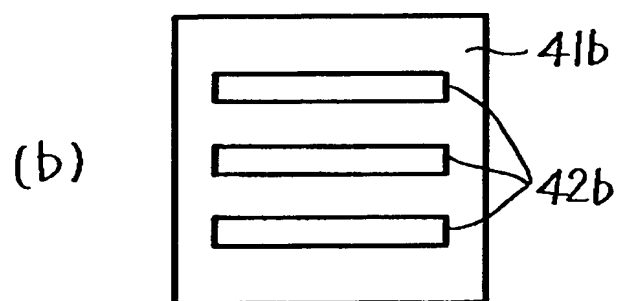
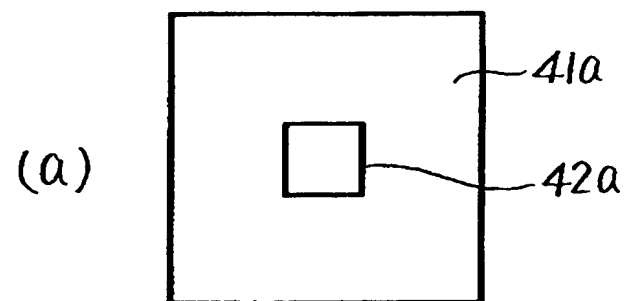
(a)



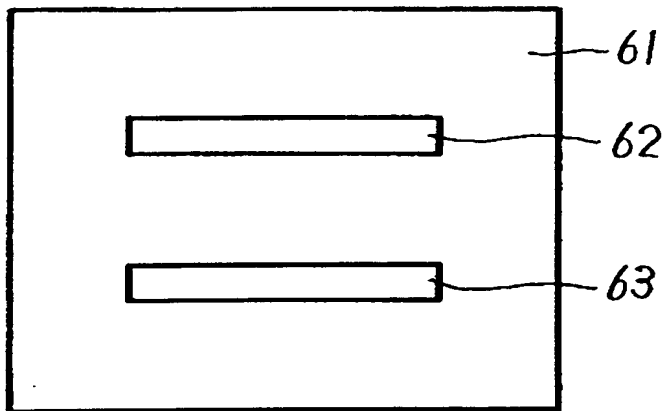
(b)



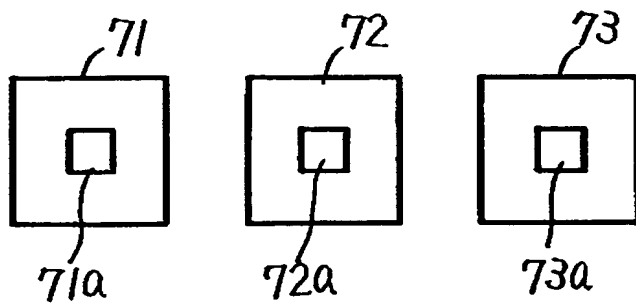
【図 7】



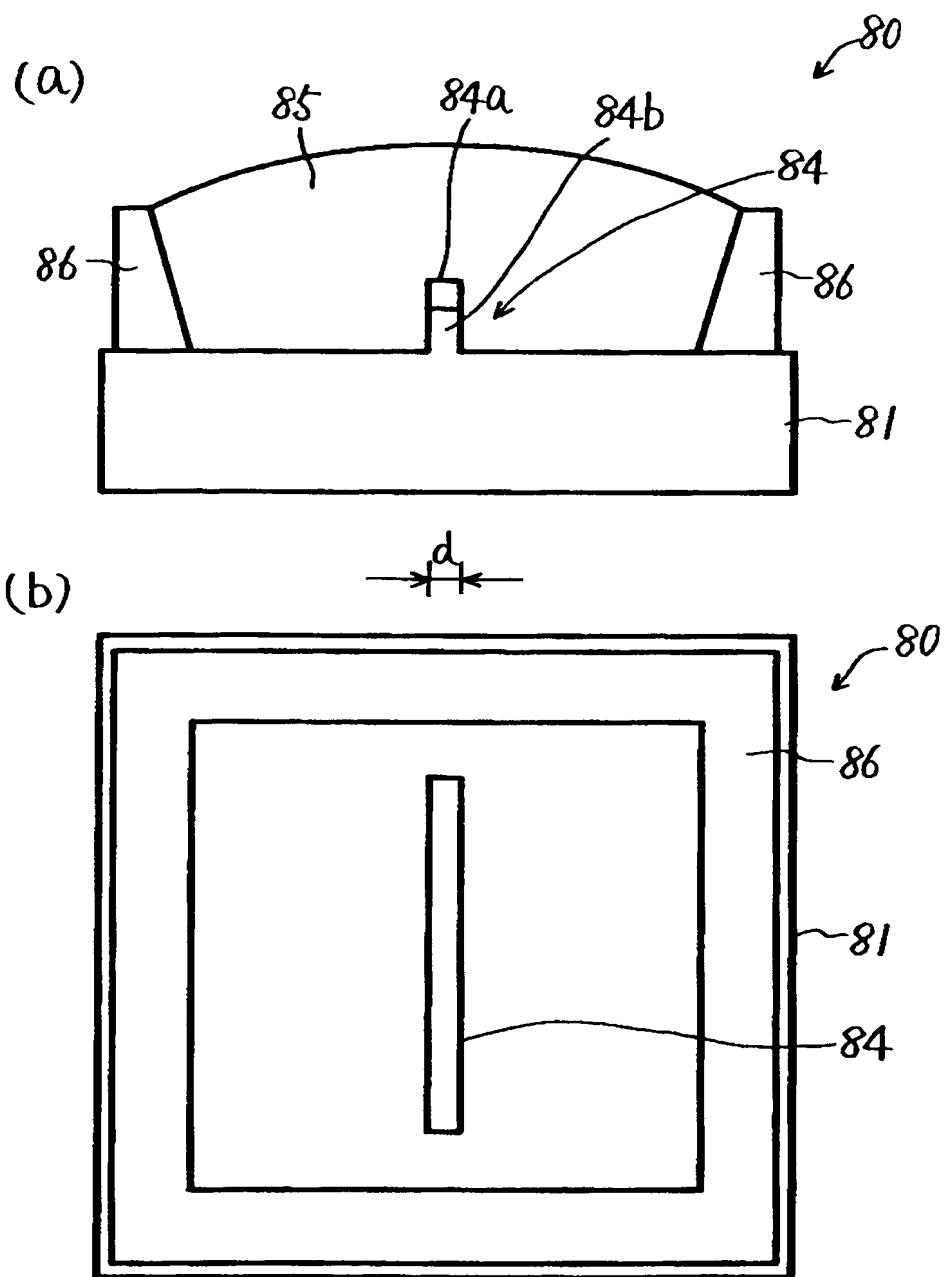
【図 8】



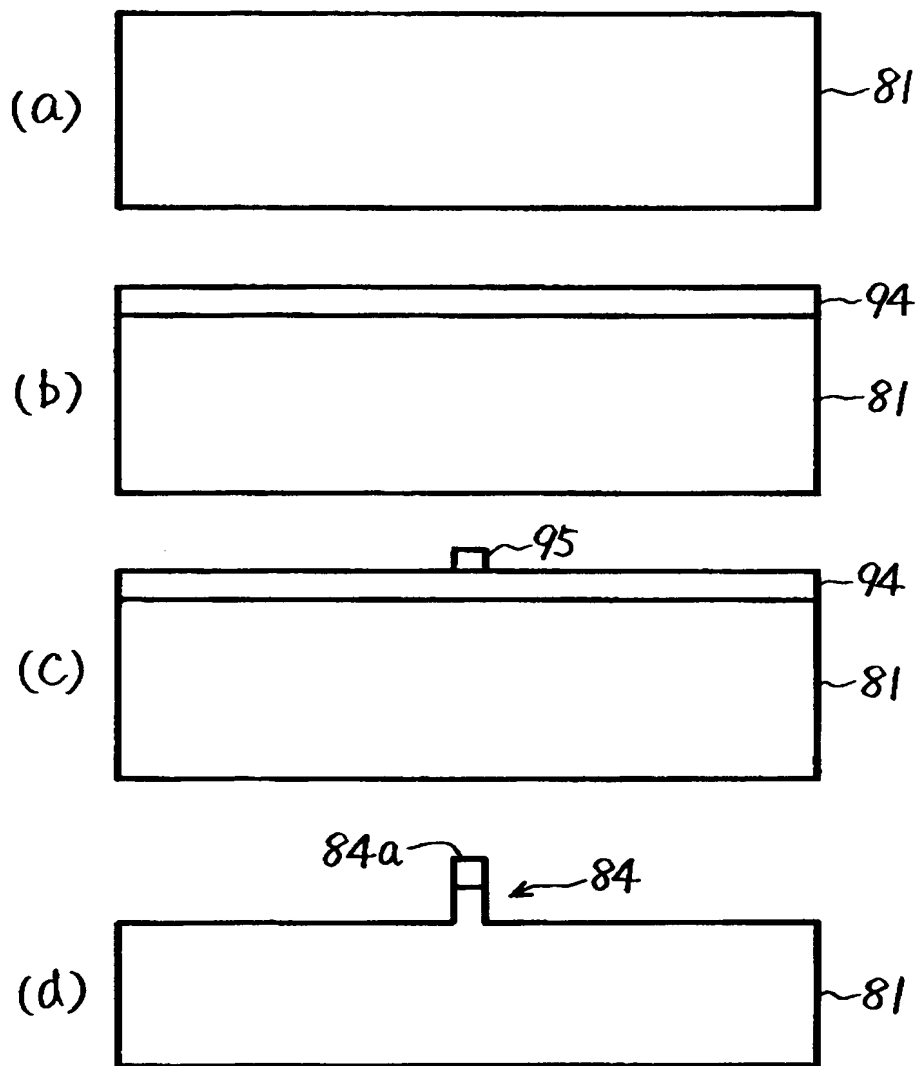
【図 9】



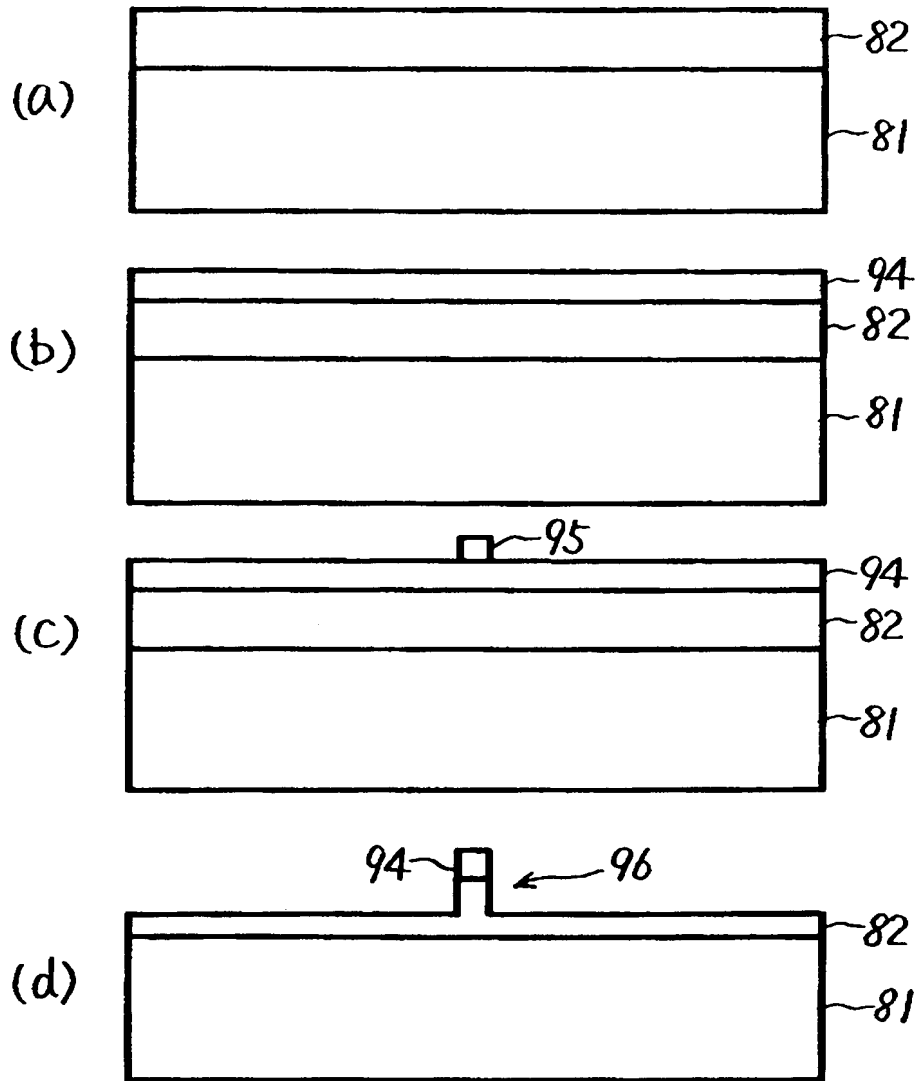
【図 1 0】



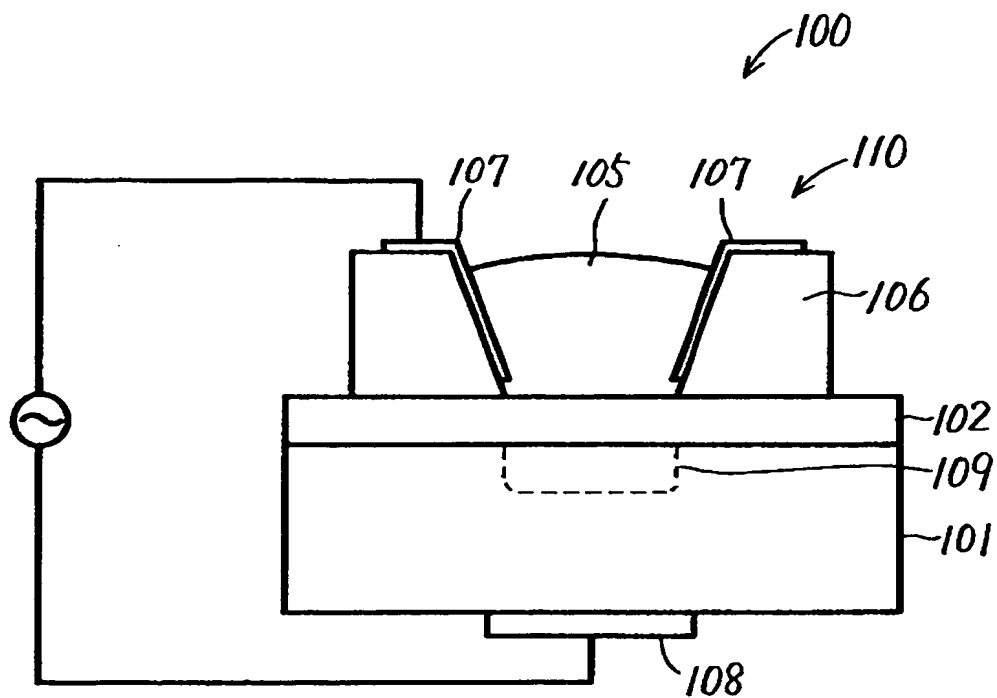
【図 1 1】



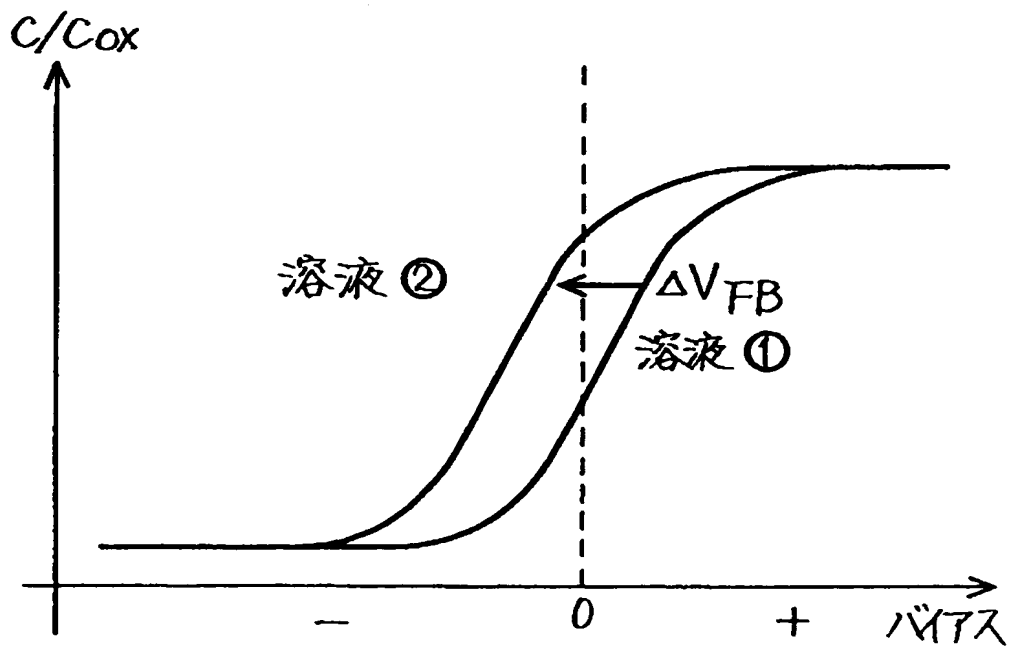
【図 1 2】



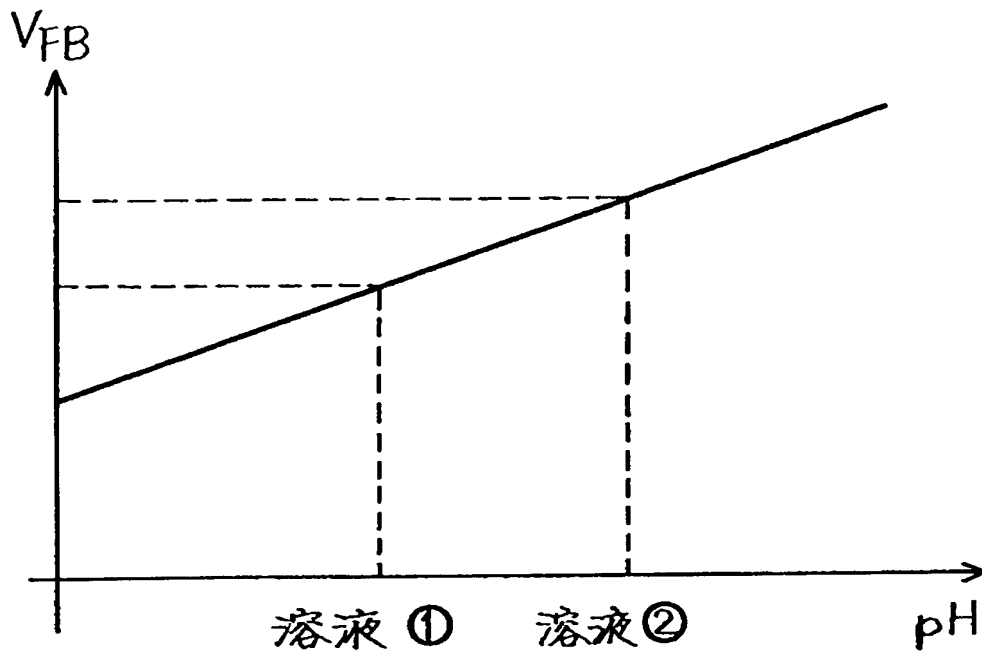
【図13】



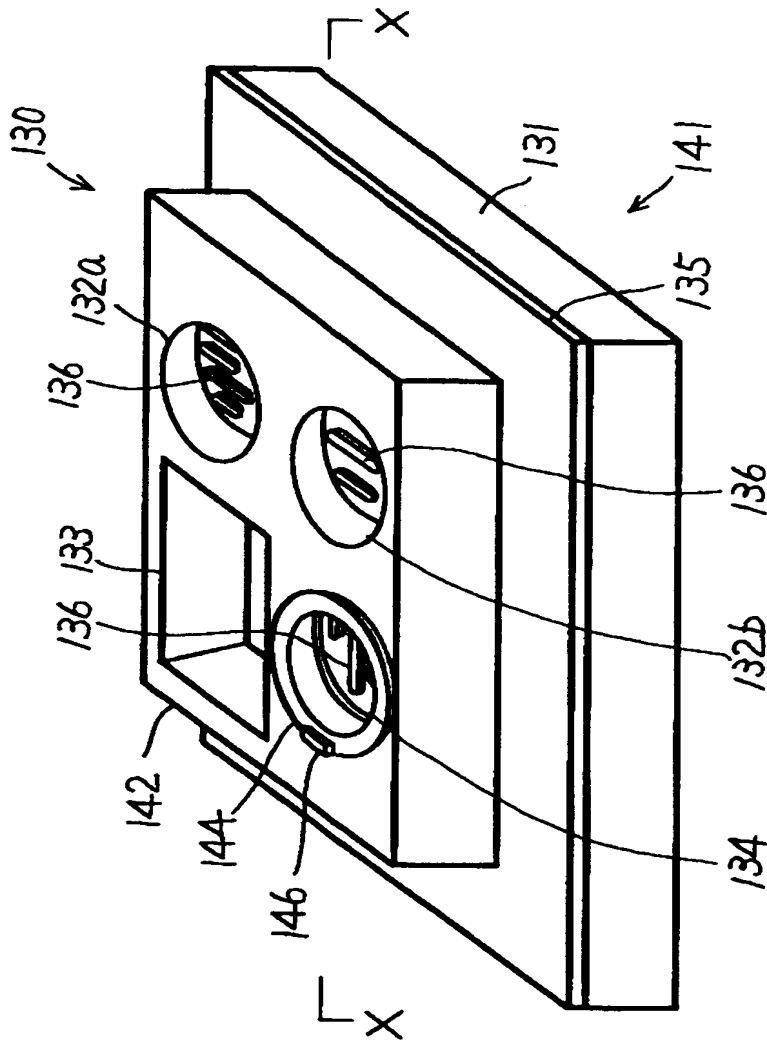
【図14】



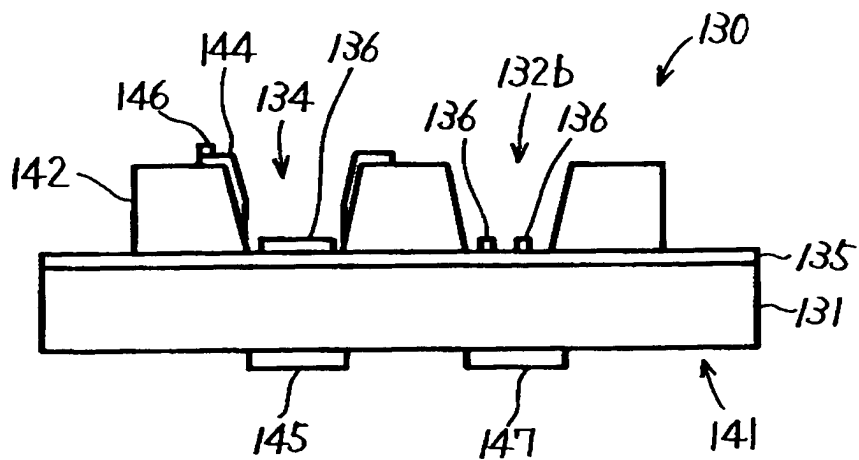
【図 1 5】



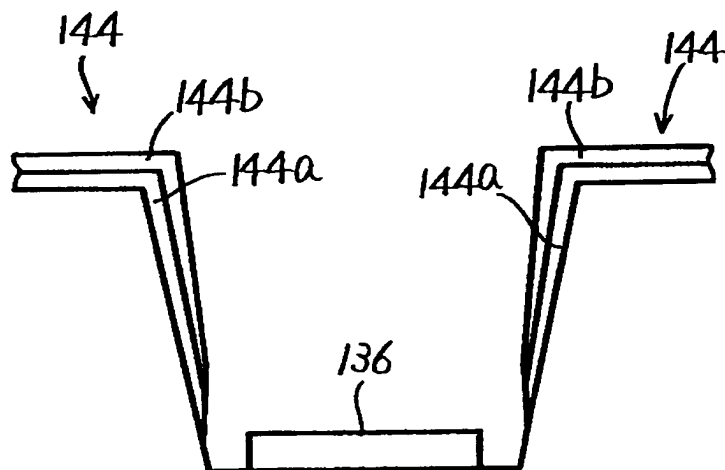
【図 1 6】



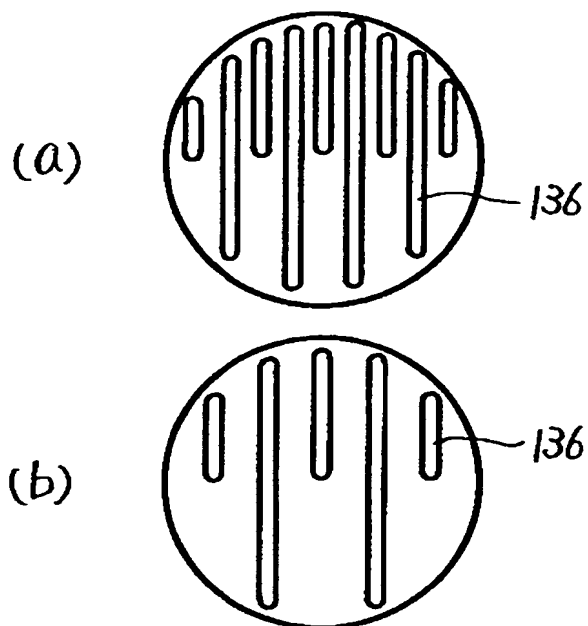
【図 1 7】



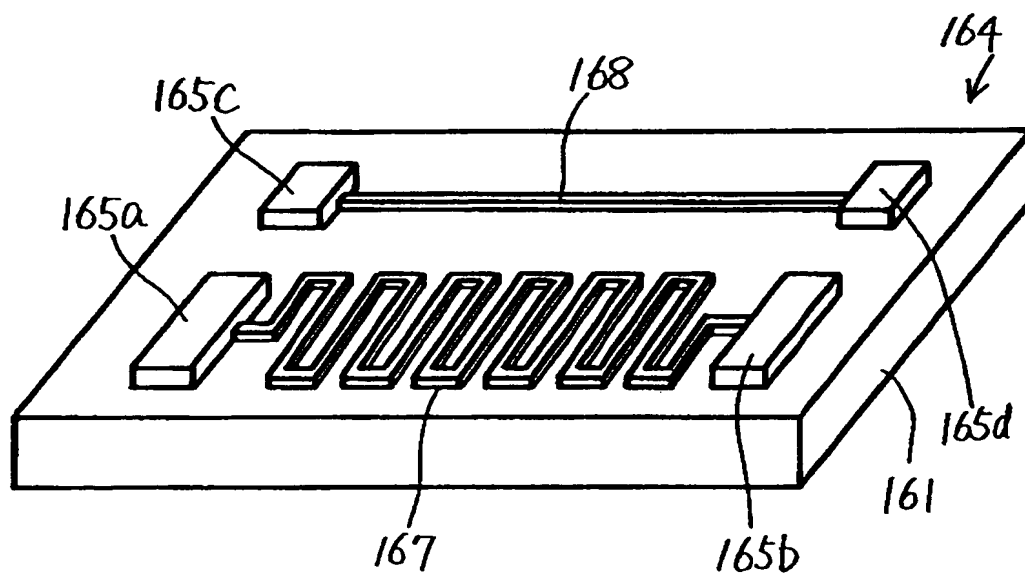
【図 1 8】



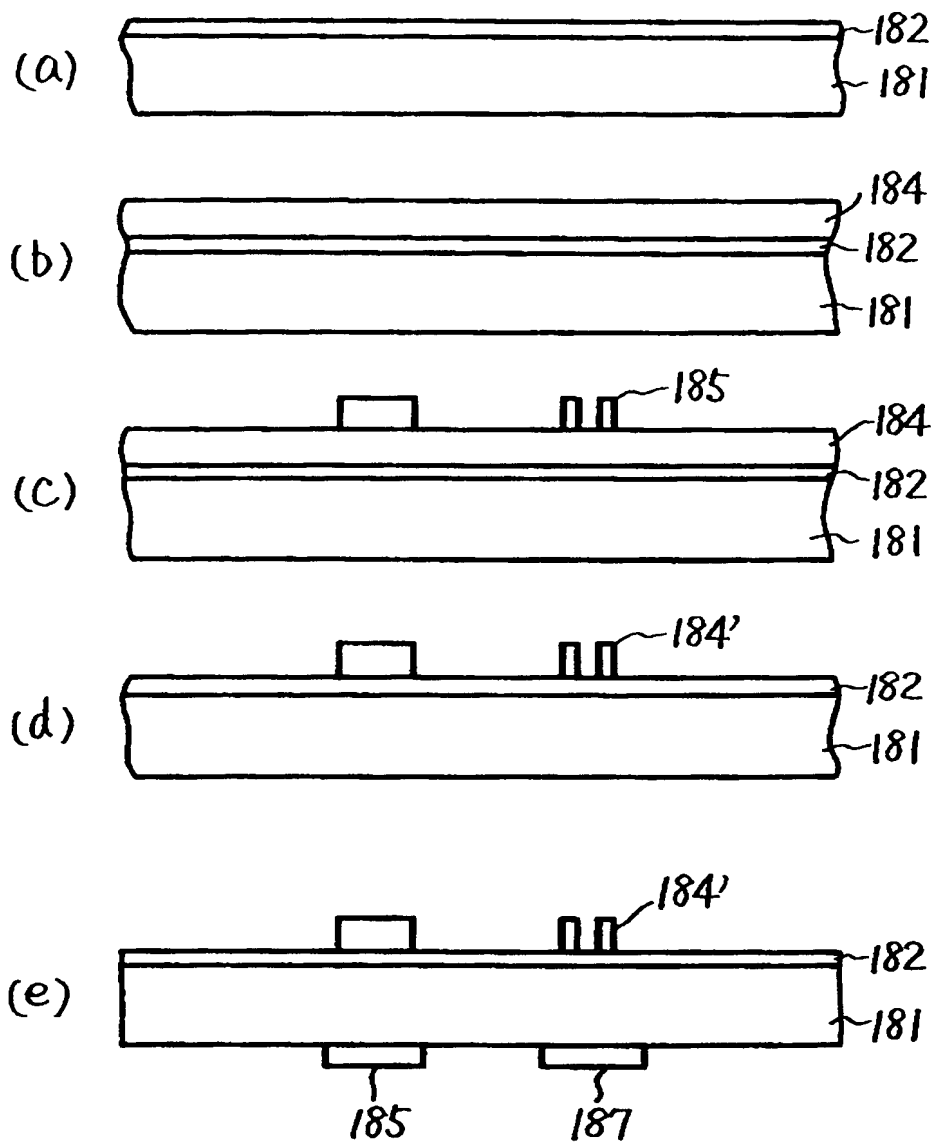
【図 1 9】



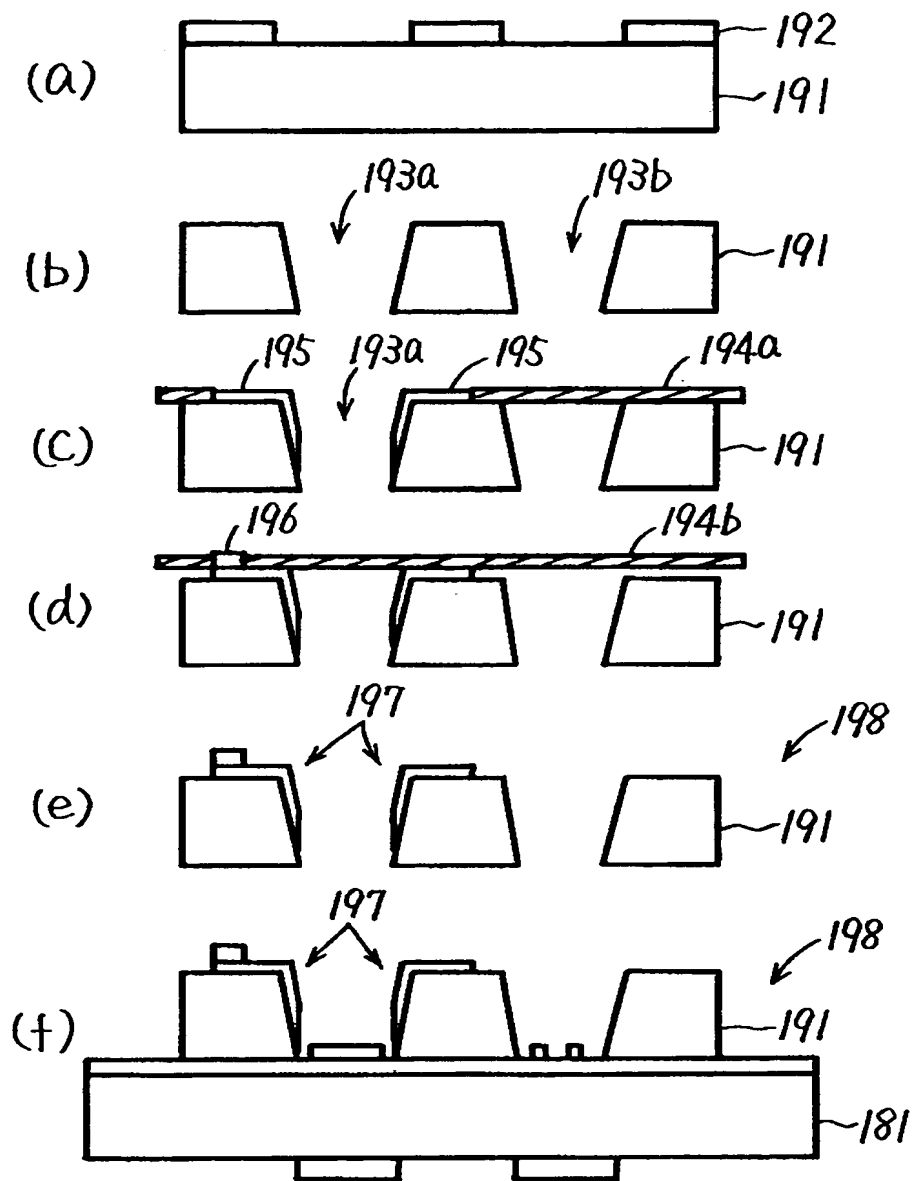
【図 2 0】



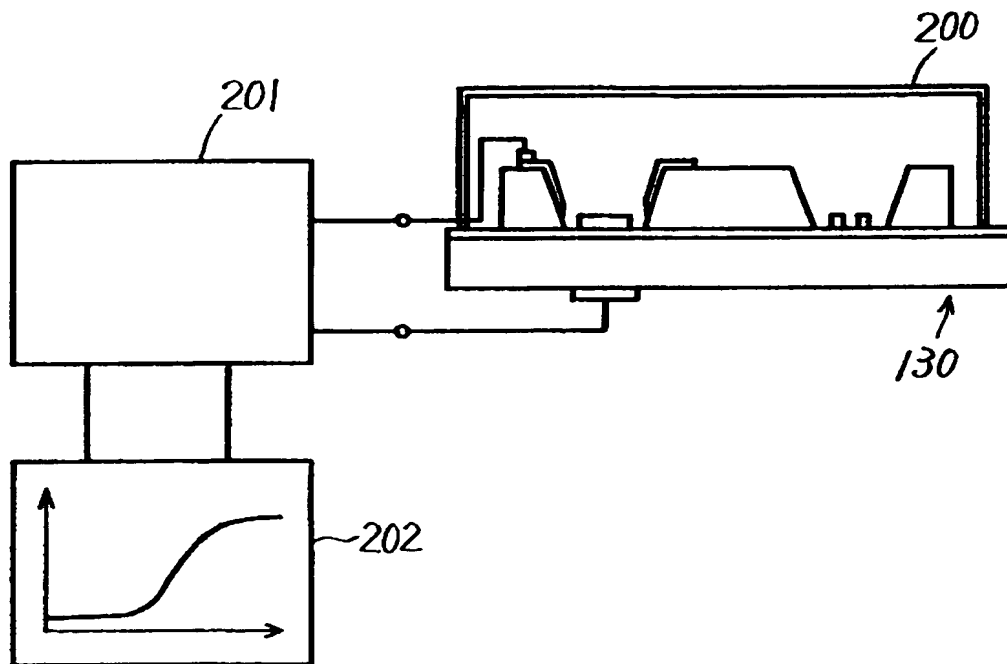
【図 2 1】



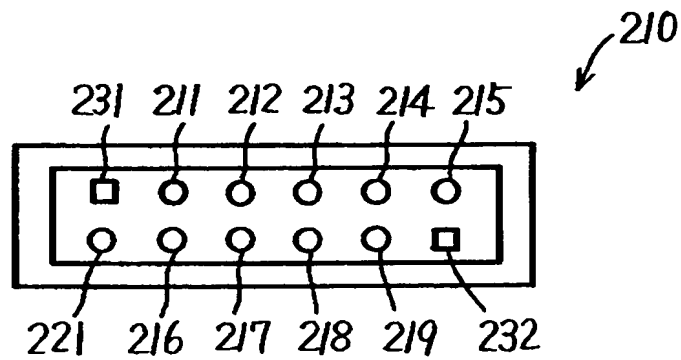
【図 2 2】



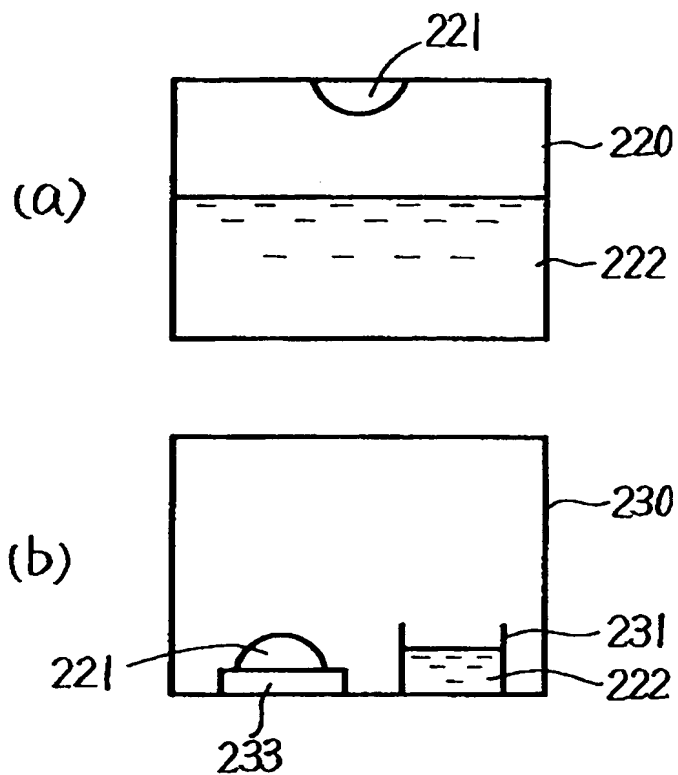
【図 2 3】



【図 2 4】



【図 2 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 X線構造解析を可能にし得る大型の結晶をもたらすことができ、かつ生成した結晶を破壊することなく容易に取り出すことができる装置を提供する。

【解決手段】 結晶成長用装置 1 0 は、第 1 の固体表面 1 1 a と、アイランド 1 2 上に与えられる第 2 の固体表面 1 2 a とを備える。第 1 の表面 1 1 a と第 2 の表面 1 2 a とは、結晶化すべき有機分子 1 3 を含む溶液 1 4 と接触するとき、互いに異なるゼータ電位を示す。また、第 2 の表面 1 2 a は、その上で有機分子 1 3 の結晶が成長できるよう第 1 の表面 1 1 a よりも有機分子 1 3 をより強く静電的に吸着させることができる。さらに、第 2 の表面 1 2 a の幅は、有機分子 1 3 の結晶がその表面をはみ出して成長できるよう、1 0 ～ 2 0 0 μ m の範囲で狭くされている。

【選択図】 図 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 2 1 1 8]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 1 6 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区北浜 4 丁目 5 番 3 3 号

氏 名

住友金属工業株式会社